



# Lien entre la diversité microbienne, la stabilité des communautés microbiennes et le turnover des matières organiques du sol

Vincent Tardy

## ► To cite this version:

Vincent Tardy. Lien entre la diversité microbienne, la stabilité des communautés microbiennes et le turnover des matières organiques du sol. Sciences de la Terre. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS081 . tel-01279426

**HAL Id: tel-01279426**

**<https://theses.hal.science/tel-01279426>**

Submitted on 26 Feb 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE  
ÉCOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT – SANTÉ

# THÈSE

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bourgogne**

En Sciences de la Terre

Spécialité : **Ecologie Microbienne**

Présentée par **Vincent TARDY**

---

Lien entre la diversité microbienne, la stabilité des communautés microbiennes et le turnover des matières organiques du sol

---

Préparée au sein de  
l'Unité Mixte de Recherche Agroécologie à l'INRA de DIJON dans le pôle **Écologie des communautés et Durabilité systèmes agricoles (EcolDur)**

Thèse soutenue publiquement le 25 Novembre 2014

**devant le jury composé de :**

Jean MARTINS - Chargé de Recherche, CNRS, Grenoble	Rapporteur
Marc BUÉE - Chargé de Recherche, INRA, Nancy	Rapporteur
Philippe CUNY – Professeur, Université Aix-Marseille	Examineur
Raphael GROS – Maître de Conférences, Université Aix-Marseille	Examineur
Roberto GEREMIA – Directeur de Recherche, UJF, Grenoble	Examineur
Dirk REDECKER – Professeur, Université de Bourgogne, Dijon	Examineur
Lionel RANJARD – Directeur de Recherche, INRA, Dijon	Directeur de thèse
Pierre-Alain MARON – Chargé de Recherche, INRA, Dijon	Co-directeur de thèse



*A la Reine des Bois, mes Racines et mon Buisson*



# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier la région Bourgogne pour le financement de ce travail ainsi que **Philippe LEMEANCEAU**, directeur de l'UMR Agroécologie de l'INRA de Dijon, pour m'avoir accueilli dans ses locaux.

Je remercie les membres du jury. Merci à Messieurs **Jean MARTINS** et **Marc BUÉE** d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également les examinateurs, Messieurs **Philippe CUNY**, **Raphael GROS**, **Roberto GEREMIA** et **Dirk REDECKER** d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de pilotage de thèse, **Jean-Christophe LATA**, **Jean-Christophe ROGGI**, **Olivier MATHIEU** et **Jean LÉVÊQUE** pour leur sympathie et leurs conseils avisés sur le déroulement de mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier plus que vivement mes directeurs de thèse **Lionel RANJARD** et **Pierre-Alain MARON** de m'avoir accompagné pendant ces quatre années sur le chemin du doctorat. Merci **Yo**, pour ta disponibilité, ton soutien, tes conseils, mais aussi pour tes blagues et ta façon très amicale de me tapoter l'épaule. Un très grand **MERCI** à toi, **PAM**, pour m'avoir encadré et transmis tes connaissances tel un maître Jedi à son Padawan. Merci pour la confiance que tu as eue à mon égard, que ce soit pour le déroulement des manips, l'analyse des données et la rédaction des papiers. Merci également pour ton soutien constant dans les moments difficiles, ta patience et ta combativité.

\*\*\*\*\*

Je tiens également à remercier toutes les personnes de mon équipe qui m'ont aidé dans la réalisation de ce projet de thèse.

Merci à **Sébastien Terrat-octet** (le geek). A mon sens, tu as vécu un peu trop longtemps dans un monde parallèle mais tes histoires et tes blagues d'un genre un peu particulier m'ont bien fait rire. Merci pour ton aide et ta disponibilité pour les analyses bioinformatiques. Merci à **Mélanie** et **Virginie**, toujours disponible pour débloquer les situations dans les labos. Mél, merci encore d'avoir pris le temps de me former au bonheur de la biologie moléculaire. Merci à **Samuel** (le grincheux) pour ton aide plus que bienvenue dans la mise en place du site de Lusignan. Merci également à **Walid** (Biomasse = 100, tu walid le modèle ?), **Christophe Mougél** (il est où ?? dans le BET), **Anne-laure** (The Queen of the dance floor, sacrée piscine !!!), **Florence**, **Julie Tripied**, **Céline** (indispensable pour arracher les touffes), **Fabiolita**, **Pascalito**, **Julie Hardial** et tous les stagiaires que j'ai pu rencontrer.

Je tiens particulièrement à remercier les personnes qui ont partagé mon bureau pendant ces quatre années. Merci à **Ams** pour ta compagnie, ta sagesse et les discussions footballistiques. Merci à **Tiff-tiff** d'avoir partagé si longtemps avec moi le bureau (ou plutôt notre appartement !). Je n'oublierai pas nos fous rires, nos chansons du jour et nos parties de pêche. Merci également de m'avoir dépanné sur les coups durs avec tes bras robotiques et ta façon de pipeter bien à toi. Merci à **Emilie** pour son agréable compagnie pendant ces quelques mois



dans notre bureau (Ça va être bientôt ton tour, bonne chance !). Et puis, comment l'oublier... Merci à **Sophie**, petite dernière à avoir rejoint l'antre de la folie. Merci pour tes conseils et tes nombreuses discussions (mais qu'est ce que tu es bavarde ;-)).

Pour finir, un grand **MERCI** à la « bande de connards » avec qui j'ai partagé de très bons moments au sein de l'équipe mais aussi à l'extérieur du labo. Merci à **Cédrix le breton** pour tes conseils, ton soutien et ton aide précieuse pour cette dernière année de thèse. Merci au **Pierrot**, le roi de l'apéro, pour m'avoir appris à décapsuler une bouteille de bière avec classe (en parlant de classe, je dois encore 20 euros à ta mère ...). Merci au **Flo**, ma couille droite, pour s'être enrôlé avec moi dans l'infanterie des tirailleurs sénégalais. J'espère bien te revoir à Colmar où il paraît que l'on se marre en mâtant des boula... Enfin, merci mon **Faf** (Wesh le Faf !!!) pour ton agréable compagnie et tous ces moments de bavardage qu'on a eu ensemble. Merci de m'avoir fait connaître Dijon et ses environs..., ce qui s'est finalement résumer à connaître le Flannery's dans ses moindres recoins ;-). Merci également pour cette belle aventure de **Miksi**, sur le net comme à Paris.

En écrivant ces remerciements, j'ai eu plaisir à me rappeler ces premiers moments de thèse ou notre équipe (enfin, du moins une partie) fut un temps et bon nombre de soirs, virtuelle. Comme marqueur temporel de ces temps glorieux, je voudrais remercier ces avatars qui ont bien souvent fait mon succès ;-)) sur les champs de bataille. Merci à **Geronimo** (on te voit quand même quand tu t'allonges dans la neige), **Gunther** (pas mal !!! le camouflage cadavre...), **Pyro man** (t'es chiant avec la traillette), **Nicos** (la grosse mitraille), **Grincieux** (Cherche pas... je suis dans la maison), **el fafa** (toujours garant du M1), **flo** (BAR à couda...), **Gna !** (reste comme ça, ne bouge surtout pas) ainsi que toutes les **chaires à canon** (merci !!!).

\*\*\*\*\*

Je voudrais exprimer maintenant mes sincères et chaleureux remerciements à tout le personnel de l'UMR Agroécologie de Dijon.

Merci aux secrétaires, **Fabienne**, **Catherine**, **Stéphanie**, **Sylvie** et **Samuel** d'avoir géré parfaitement tous les aspects administratifs de ce projet.

Merci à **BLB**, agent de la CIA, qui toutes les semaines m'a permis de finir cette thèse dans de bonnes conditions (Il est où ce vtardy ??? Il est où ce vtardy ???).

Merci à **Christian** pour sa sympathie et son aide dans la recherche de post-doc.

Merci à toute l'équipe de l'autre bout du couloir, **Laurent**, **Fabrice**, **Romain**, **Aymé**, **David**, **Marion**, pour leur bonne humeur et leur sympathie. **Aymé**, merci encore d'avoir été mon précepteur dans les analyses statistiques. **Marion Devers** et trois ..., merci pour les nombreuses fins de semaine (tu portes vraiment bien ton surnom). Et puis le **David**, merci d'avoir écumer avec moi les troquets Dijonnais (à très bientôt sur Montpellier !!!).

Bien entendu, je n'oublie pas de remercier **Maître Cordeau** qui, dans son bâtiment de l'autre côté, a toujours le mot rigolo (j'adore ton anecdote sur les toilettes de l'INRA...).

Je tiens aussi à remercier les autres thésards et post-doc avec qui j'ai partagé de bons moments et qui m'ont été aussi de très bons conseils. Je pense notamment à **Marine**, **Anne-Laure**, **Aude** (♪ loca, loca, loca ♪♪), **Virginie**, **Chloé**, **Marie Lara**.





\*\*\*\*\*

Dans mes travaux de thèse, j'ai été amené à m'exiler pour rencontrer d'autres laboratoires et d'autres personnes.

Mon premier exil est géographiquement très proche, puisqu'il suffit de traverser la rue de Sully pour rencontrer le laboratoire Biogéoscience. En ces murs, je remercie chaleureusement **Olivier MATHIEU**, **Jean LÉVÊQUE**, **Marie Jeanne MILLOUX** et **Julien GUIGUE** pour l'analyse des nombreux petits paquets de fioles de CO<sub>2</sub> amenés régulièrement.

Mon deuxième exil est lui beaucoup plus ambitieux puisqu'il me faut rejoindre Lusignan et ses contrées afin de remercier chaleureusement le personnel du SOERE-ACBB.

Merci à **Abad CHABBI** et **Xavier CHARRIER** de m'avoir donné la possibilité et les moyens nécessaires de mettre en place un dispositif de terrain sur leur site expérimental.

Merci à **Christophe de BERRANGER**, pour avoir pendant un an, suivi la minéralisation de mes luxueux petits résidus de blé soigneusement incorporés au sol et **Christophe HUGUET** pour avoir désherbé la moindre petite plante qui avait l'audace de coloniser mon dispositif.

\*\*\*\*\*

Parmi les activités extra-thésiennes, le sport a été sans aucun doute un paramètre plus qu'essentiel à ma stabilité. Je tiens particulièrement à remercier Denis le coach et toute l'équipe du **DUC** avec qui j'ai partagé de bons moments footballistiques. Merci pour ces matchs les dimanches matins, sous des conditions météorologiques souvent bien difficiles et sur des terrains pas toujours aux normes (Ah !!! les champs de patates de Dijon !!!).

Et puis, comment oublier de remercier notre belle équipe : le **FC Miksi** - cette équipe née d'une rencontre entre passionnés du ballon rond aimant technique, justesse, engagement et efforts intenses.... Ces remerciements ne pouvaient figurer sans une présentation complète de chacun des joueurs qui la compose et qui ont fait sa gloire.

**Merci à :**

- **Daevid Bru** notre ange gardien.
- **Cedrix** la falaise bretonne, tous simplement infranchissable.
- **Steph** notre Bulldozer ou notre panzerfäust : tes frappes dépassent souvent le mur du son et tes conseils sur le terrain m'ont souvent dégommé les tympans ;-).
- **Gary** notre opportuniste de la frappe (mais quand même !!!, pas du milieu de terrain... ;-))
- **Aymé** alias *mémé* et ses célèbres (mais trop rares... ;-)) coups de reins.
- **Le faf** : ton crochet et ta frappe de grand-mère ont toujours été des atouts pour l'équipe...
- **Les frères Duhoux** ou les infatigables. Merci, je ventile moins quand vous êtes là.
- **Abdel** alias la *faucheuse marocaine*: merci pour ton sourire et les cicatrices que tu as laissé sur mes tibias (jiii tiii pa touché !!!).

J'aime à me rappeler ce tournoi de foot-entreprise, cette soirée arrosée de champagne et de bière, ces douches... et cet hymne à la victoire (♫ Mexico ♫♫). Merci pour ces moments et bonne continuation au FC Miksi.



\*\*\*\*\*

Je quitte Dijon et son monde, la thèse et ses rencontres, pour revenir aux sources et je tiens à m'excuser par avance pour ces quelques lignes dénuées de sens, ce champ lexical complexe et ces néologismes - obtenus bien trop souvent sous l'influence d'une boisson anisée.

Il y a maintenant 29 ans que naquit plusieurs individus sur les hauteurs bétonnées et brumeuses de Montmein. Montmein ? Tu ne connais PAS Montmein ??? C'est vers Lyonne Zyonne Babylonne. Sous l'impulsion de JAH, le rastafari, ces êtres se sont réunis pour ne former qu'un ; **le 88Style** !! Des amis d'enfance me diriez-vous ??? Et non « Pélo(tte) », des frères !... Merci à *Scooter, Régiiii, Seb, Reduan, Ragoune, Ien-ien, Jah, Mister Burns, Tisba, Chicken, Suceuse, Ketchupy san, Rabat* et leurs compagnes Milie, Marion, Amandine, Bérénice de Condrieu, Maëllis de Paris. Merci les **Srabes** de m'avoir accompagné de la maternelle jusqu'à maintenant (et même le jour de ma soutenance de thèse), d'avoir franchi avec moi « ♪ step by step ♪♪ » ces trente premières années. Ce groupe fait partie des exceptions exceptionnelles et je ne peux que lui souhaiter un bel avenir. En espérant tous vous retrouvez bientôt pour évoquer ces quelques mots : « Wesh les pelos, bien ou bien ?? Tu paye ton Tricard .... ».

\*\*\*\*\*

Pour terminer, je remercie mes deux grandes familles (la **Drômoise** et l'**Ardéchoise**) pour m'avoir toujours soutenu pendant ces années.

A mon grand père, **Paul**. Merci pour tous ces moments partagés avec toi (les truites, les morilles, la Toume de chèvre, le Cocor, et le Dring Cocor ;-)), qui fut, sans nul doute, déterminants dans mes choix professionnels

A ma frangine, **Céline**, que j'ai trop peu vue pendant ces années d'études (promis, je me rattrapai). Merci pour ton soutien constant et la bise à tes deux hommes.

A mes vieux, **Pouny-Mouny**. Je me revois encore, 12 ans en arrière, entrain de tondre la pelouse du Parc de Parilly sur une *KUBOTA F3680* dans le but de mener une carrière de paysagiste. Aujourd'hui, j'écris mes remerciements de thèse pour l'obtention du grade de docteur en science de la terre... Je ne comprends pas encore tout à fait mon parcours, mais je suis sûre d'une chose... C'est que vous avez toujours respecté mes choix et permis de réaliser mes projets, et pour cela, je vous en serais toujours reconnaissant. **Merci.**

Enfin, il manque à ces remerciements une personne plus qu'essentielle à mon parcours. Une personne qui, selon moi, incarne à elle seule un pays. Un pays dont on dit que sa beauté est naturelle, que son parfum est subtil et son caractère sauvage. Vous l'avez reconnu ?? Ce pays, c'est l'**ARDECHE** !!! Un très grand MERCI à toi, ma **Bichette** d'avoir (sur)vécu avec moi à cette aventure.



## RESUME

Les communautés microbiennes sont des acteurs majeurs du fonctionnement biologique du sol à travers notamment leur implication dans les cycles biogéochimiques (C, N, P...). Dans les agro-écosystèmes, la diversité de ces communautés est régulièrement modifiée par des perturbations liées aux pratiques agricoles et la question des conséquences de ces modifications pour le maintien du fonctionnement biologique et des fonctionnalités des systèmes agricoles est aujourd'hui centrale. Si le rôle de la diversité biologique pour le fonctionnement des écosystèmes a été bien étudié chez les macro-organismes, et notamment les plantes ; la relation biodiversité/activité est encore très mal connue pour les microorganismes du sol. Pourtant, dans la mouvance agroécologique actuelle, cette connaissance est nécessaire pour définir de nouvelles pratiques culturales intégrant une gestion de la diversité microbienne pour une utilisation durable des agrosystèmes.

Dans ce travail, l'objectif général était de tester l'importance de la diversité pour la stabilité (résistance/résilience) et l'activité des communautés microbiennes (bactéries et champignons) impliquées dans les transformations de la matière organique dans le sol (MOS), une fonction déterminante pour la fertilité des sols, la qualité de l'environnement et les changements globaux. D'un point de vue expérimental, nos questions ont été abordées par le couplage d'expérimentations au laboratoire avec des échantillonnages réalisés au terrain. Dans un premier travail basé sur une manipulation de la diversité au laboratoire, nous avons montré que la stabilité de la structure et de l'activité des communautés en réponse à différentes perturbations est positivement liée à la diversité microbienne (*i.e.* nombre d'espèces). Ce lien a ensuite été validé par une expérimentation basée sur un échantillonnage de terrain qui nous a permis de démontrer (i) que la diversité microbienne peut être modulée (augmentée ou diminuée) en fonction de l'intensité d'usage des sols, et (ii) que la minéralisation de la matière organique est plus intense dans les sols présentant les plus hauts niveaux de diversité. Enfin, dans le cadre d'une expérimentation réalisée au terrain (SOERE-ACBB, Lusignan), nous avons montré que la réponse des communautés de bactéries et de champignons à un apport de résidus de blé, en termes de successions de populations et d'activité de minéralisation de la matière organique, dépend de l'historique cultural du sol.

Ces travaux apportent de nouvelles connaissances sur l'importance de la diversité microbienne (richesse, composition) pour la stabilité et l'activité des communautés impliquées dans les transformations de la matière organique dans le sol. Ils montrent également que la modulation de la diversité des communautés microbiennes du sol par les pratiques agricoles, présentes ou passées, peut affecter significativement le turnover de la MOS.

**Mots clés :** communauté microbienne / sol / diversité / stabilité / matière organique



# ABSTRACT

Soil microbial communities act as important agents of the biological soil functioning, particularly through their involvements in the transformations of biogeochemical cycles (C, N, P...). In agro-ecosystems, the diversity of these communities is affected by perturbations associated to agricultural practices, and the significance of these modifications in terms of preservation of biological functioning and sustainability of agricultural systems has emerged as a central issue in the environmental sciences. Whereas the role of biodiversity has been well studied for macroorganisms, in particular for plants; the biodiversity/activity relationship is still largely unknown for soil microorganisms. However, in the current agro-ecological movement, this knowledge is needed to define new agricultural practices including a best management of microbial diversity for the sustainable use of agro-ecosystems.

In this context, the objective of this Phd was to test the significance of microbial diversity for the stability (resistance/resilience) and the activity of microbial community (bacteria and fungi) involved in the turnover of soil organic matter, a major function for soil fertility, environment quality and global changes. From an experimental point of view, these issues were addressed by coupling laboratory with field experiments. In a first work, by manipulating microbial diversity in laboratory condition, we have shown that the stability of both microbial genetic structure and activity in response to different perturbations is positively linked to microbial diversity (i.e. number of species). This link was then validated by a sampling based on a field experiment that allowed us to demonstrate that (i) the soil microbial diversity can be modulated (increased or decreased) depending the intensity of land use management, and (ii) the mineralization of organic matter is more intense in the soil with the highest level of diversity. Finally, thanks to an experiment carried out in the field (SOERE-ACBB, Lusignan), we showed that the response of bacterial and fungal communities to wheat residues supply in terms of successions of microbial populations and activities of organic matter mineralization depends on the soil management history.

These works provide new insights into the significance of microbial diversity (richness, composition) for the stability and the activity of communities involved in the soil organic matter turnover. They also suggest that the modulation of the diversity of soil microbial communities by agricultural practices, past or present, can significantly affect the turnover of soil organic matter.

**Keys words:** microbial community / soil / diversity / stability / soil organic matter





# SOMMAIRE

<b>Liste des figures .....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des encarts .....</b>	<b>4</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>5</b>
<b>Introduction Générale.....</b>	<b>6</b>
<b>Chapitre I : Synthèse Bibliographique.....</b>	<b>14</b>
<b>1- Qu'est ce que le sol ? .....</b>	<b>15</b>
1.1- Une mine de services écosystémiques .....	16
1.2- Une matrice complexe, hétérogène mais structurée.....	16
1.3- Un réservoir de biodiversité.....	17
<b>2- Les communautés microbiennes du sol.....</b>	<b>19</b>
2.1- Un rôle majeur dans le fonctionnement biologique du sol.....	19
2.2- Une distribution hétérogène de la diversité et de l'activité microbiennes .....	19
2.3- Outils de caractérisation de la communauté microbienne du sol .....	20
2.3.1- <i>Quantification des communautés microbiennes telluriques.....</i>	<i>21</i>
2.3.2- <i>Caractérisation de la diversité des communautés microbiennes du sol .....</i>	<i>23</i>
2.3.3- <i>Outils de caractérisation de l'activité des communautés microbiennes .....</i>	<i>25</i>
<b>3- Interactions matière organique/communautés microbiennes dans le sol .....</b>	<b>27</b>
3.1- Réponse des communautés microbiennes à l'apport de résidus végétaux .....	27
3.2- Caractéristiques écologiques de la composante microbienne impliquée dans la dégradation de la matière organique .....	28
3.2.1- <i>Implication de la composante microbienne dans le « Priming Effect » .....</i>	<i>30</i>
3.3- Rôle de la diversité microbienne dans le fonctionnement biologique des sols.....	31
3.4- Manipulation de la diversité microbienne d'un sol.....	32
3.5- Relation entre la diversité microbienne et le cycle du carbone.....	33
3.5.1- <i>Relations neutres.....</i>	<i>34</i>
3.5.2- <i>Relations positives.....</i>	<i>34</i>
3.5.3- <i>Relations négatives.....</i>	<i>36</i>
3.6- Relation entre la diversité microbienne, la stabilité fonctionnelle et structurale des communautés microbiennes. ....	37
3.6.1- <i>Composantes et mesures de la stabilité des communautés microbiennes.....</i>	<i>37</i>
3.6.2- <i>Relations entre diversité microbienne et stabilité.....</i>	<i>38</i>
3.6.3- <i>Facteurs influençant la relation diversité-stabilité .....</i>	<i>40</i>
<b>4- Conclusion .....</b>	<b>43</b>
<b>Chapitre II : Influence de la diversité microbienne sur la stabilité structurale et fonctionnelle des communautés .....</b>	<b>44</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>48</b>
<b>1- Introduction.....</b>	<b>49</b>



<b>2- Results .....</b>	<b>52</b>
2.1- Microbial density .....	52
2.2- Microbial diversity at T0.....	52
2.3- Response of bacterial community structure to heat and mercury stress.....	53
2.4- Response of fungal community structure to heat and mercury stress .....	54
2.5- Response of soil respiration to heat and mercury stress.....	54
<b>3- Discussion.....</b>	<b>56</b>
3.1- Diversity affects population dynamics and functional response of microbial communities to heat shock.....	57
3.2- Diversity affects population dynamics but not the functional response of microbial communities to heavy metal pollution .....	59
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>60</b>
<b>Supporting information .....</b>	<b>61</b>
Appendix S1: Experimental procedures .....	61
<i>S1.1- Soil .....</i>	<i>61</i>
<i>S1.2- DNA extraction and microbial abundance characterization .....</i>	<i>61</i>
<i>S1.3- Pyrosequencing of 16S and 18S rRNA gene sequences .....</i>	<i>61</i>
<i>S1.4- Bioinformatics analysis of 16S and 18S rRNA gene sequences .....</i>	<i>62</i>
<i>S1.5- Automated-RISA fingerprinting of bacterial and fungal communities.....</i>	<i>63</i>
<i>S1.6- CO<sub>2</sub> measurements.....</i>	<i>63</i>
<i>S1.7- Statistical analysis.....</i>	<i>63</i>
Appendix S2: Supplementary Figures.....	65
<b>Chapitre III : Influence de la diversité microbienne sur le turnover de la matière organique du sol .....</b>	<b>66</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>70</b>
<b>1- Introduction.....</b>	<b>71</b>
<b>2- Materials and methods .....</b>	<b>73</b>
2.1- Experimental sites, soil sampling and analysis .....	73
2.2- Soil microcosms.....	74
2.3- Total and <sup>13</sup> C-CO <sub>2</sub> measurements.....	74
2.4- DNA extraction and molecular microbial biomass determination.....	75
2.5- Pyrosequencing of 16S and 18S rRNA gene sequences .....	75
2.6- Bioinformatics analysis of 16S and 18S rRNA gene sequences.....	75
2.7- Statistical analysis .....	76
<b>3- Results .....</b>	<b>78</b>
3.1- Soil physicochemical characteristics.....	78
3.2- Diversity and composition of bacterial and fungal communities.....	78
3.3- Impact of land use management on carbon mineralization.....	80
3.4- Ranking the influence of biotic and abiotic variables on C-cycling activities.....	81
<b>4- Discussion.....</b>	<b>83</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>86</b>



<b>Supporting information .....</b>	<b>87</b>
<b>Chapitre IV: Influence <i>in situ</i> de l'historique cultural sur la dynamique des communautés microbiennes du sol après un apport de paille de blé.....</b>	<b>89</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>93</b>
<b>1- Introduction.....</b>	<b>94</b>
<b>2- Materials and Methods.....</b>	<b>96</b>
2.1- Site description and sampling .....	96
2.2- DNA extraction and molecular microbial biomass determination.....	97
2.3- Pyrosequencing of 16S and 18S rRNA gene sequences .....	97
2.4- Bioinformatics analysis of 16S and 18S rRNA gene sequences.....	98
2.5- Statistical analysis.....	98
<b>3- Results .....</b>	<b>100</b>
3.1- Soil physicochemical characteristics.....	100
3.2- Impact of land use history and seasonal climatic variations on soil microbial diversity .....	100
3.3- Response of soil microbial diversity to wheat residues according to land use history .....	102
<b>4- Discussion.....</b>	<b>104</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>108</b>
<b>Supporting Information.....</b>	<b>109</b>
<b>Chapitre V : Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>112</b>
<b>1- Rappel des principaux objectifs de la thèse.....</b>	<b>113</b>
<b>2- Conclusions.....</b>	<b>113</b>
2.1- Relation diversité -stabilité structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes.....	113
2.2- Relation intensité d'usage du sol - diversité microbienne – cycle du carbone.....	115
2.3- Influence <i>in situ</i> de l'historique cultural sur la diversité des successions microbiennes induites par l'apport d'un résidu de blé.....	117
2.4- Conclusion générale.....	119
<b>3- Perspectives .....</b>	<b>120</b>
3.1- Tester la généricité du lien diversité-fonctionnement .....	120
3.2- Valider la relation diversité microbienne - cycle du carbone au terrain .....	121
3.3- Evaluer la relation diversité-cycle du carbone en intégrant d'autres niveaux trophiques .....	122
3.4- Améliorer nos connaissances sur les mécanismes du « Priming effect » .....	122
3.5- Perspectives finalisées.....	123
<b>Références .....</b>	<b>124</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>143</b>



## Liste des figures

### ❖ Introduction Générale

- Figure IG-1:** Distribution des études expérimentales examinant la relation diversité-fonctionnement des écosystèmes selon le type d'écosystèmes étudiés..... 8
- Figure IG-2:** Représentation schématique de la relation entre diversité, activités, fonctions microbiennes et services écosystémiques délivrés par les sols..... 9
- Figure IG-3:** Effet de la diversité végétale dans les systèmes de prairies sur la relation entre la biomasse moyenne et sa variabilité temporelle..... 10

### ❖ Chapitre I

- Figure I-1:** La complexité externe et interne du sol ..... 15
- Figure I-2:** Liens entre les services écosystémiques et le Bien-être de l'Homme ..... 16
- Figure I-3:** Principales étapes du développement de l'écologie microbienne..... 21
- Figure I-4:** Répartition géographique de la quantité d'ADN à l'échelle de la France ..... 22
- Figure I-5:** Schéma présentant les étapes de la technique du pyroséquençage dans le cadre de l'analyse d'un échantillon de sol..... 24
- Figure I-6:** Schéma conceptuel de l'implication des populations microbiennes selon leur attributs écologiques (stratégies-r/-K) dans les mécanismes du « Priming effect »..... 30
- Figure I-7:** Représentation des trois formes généralement admises lorsqu'une relation positive est observée entre la richesse en espèces et le fonctionnement des écosystèmes..... 34
- Figure I-8:** Représentation schématique des composantes de la stabilité (fonctionnelle ou populationnelle): résistance et résilience après une perturbation..... 37
- Figure I-9:** Dynamique fonctionnelle ou populationnelle entre la communauté **A** et **B** après une perturbation..... 40

### ❖ Chapitre II

- Figure II-1:** Représentation schématique de l'expérimentation – Dilution-inoculation. .... 45
- Figure II-2:** Soil microbial biomass (ng DNA g<sup>-1</sup> dry soil) for each treatment and level of diversity, during the incubation..... 52





<b>Figure II-3:</b> Relative abundances of both (A) bacterial and (B) fungal <i>phyla</i> of microbial community composition for each level of diversity at T0. ....	52
<b>Figure II-4:</b> Magnitude of the bacterial genetic structure modifications during 80 days after (A) heat stress and (B) mercury pollution for the three levels of diversity; D0 (black full line), D3 (grey dotted line) and D5 (light grey dashed line). ....	53
<b>Figure II-5:</b> Magnitude of the fungal genetic structure modifications during 80 days after (A) heat stress and (B) mercury pollution for the three levels of diversity ; D0 (black full line), D3 (grey dotted line) and D5 (light grey dashed line). ....	54
<b>Figure II-6:</b> Soil respiration ( $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dry soil}$ ) over 80 days after (A) heat stress and (C) mercury pollution for the three levels of diversity with D0 (black), D3 (Grey) and D5 (light grey). ....	55
<b>Supplementary Figure II-S1:</b> Rarefaction curves determined by pyrosequencing of the (A) 16S- and (B) 18S-rDNA genes obtained for three replicates of each level of diversity, based on randomly selected and filtered sequences. ....	65
<b>Supplementary Figure II-S2:</b> Factorial map of: (A) bacterial and (B) fungal phylogenetic community composition ( <i>phyla</i> ) at T0. ....	65
<b>Supplementary Figure II-S3:</b> Bacterial-ARISA profiles obtained after 10, 20, 40 and 80 days of incubation for the level of diversity D0. For each sampling date, 3 replicates of control soils (Ct) and soils spiked with mercury (Hg) were prepared. ....	65

### ❖ Chapitre III

<b>Figure III-1:</b> Localisation des trois sites expérimentaux Européens. ....	67
<b>Figure III-2:</b> Préparation des microcosmes de sol et suivi de la minéralisation de la matière organique. ....	68
<b>Figure III-3:</b> Variation of diversity indexes represented by bacterial (A) and fungal (B) richness (R) and 1/Simpson indexes (1/D) for bacterial (C) and fungal communities (D) for each level of land use management (low, medium and high) for the three LTOs (Veluwe, Berchida and Lancaster). ....	79
<b>Figure III-4:</b> Non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) ordination plot derived from weighted Pairwise UniFrac distances of (A) bacterial and (B) fungal communities for the LTO of Veluwe (□), Berchida (Δ) and Lancaster (○) with each level of intensification corresponding to low (light grey), medium (dark grey) and high (black). ....	79



<b>Figure III-5:</b> Relative abundance of both (A) bacterial and (B) fungal phyla in microbial composition according to LTO (Veluwe, Berchida and Lancaster) and level of intensification of land use management (low, med (medium) and high).....	80
<b>Figure III-6:</b> Variation of areas (mg g <sup>-1</sup> dry soil) under the cumulated CO <sub>2</sub> emission of different C-cycling activities measured according to land use management (low, medium and high) for the three LTOs (Veluwe, Berchida and Lancaster) with (A) basal mineralization (R <sub>s</sub> control soil), (B) total mineralization (R <sub>t</sub> ), (C) wheat residues mineralization and (D) Priming Effect. ....	80
<b>Supplementary Figure III-S1:</b> Variation of diversity indexes represented by bacterial (A) and fungal (B) richness (R) and 1/Simpson indexes (1/D) for bacterial (C) and fungal communities (D) for each LTO (Veluwe, Berchida and Lancaster). ....	87
<b>Supplementary Figure III-S2:</b> Variation of areas (mg g <sup>-1</sup> dry soil) under the cumulated CO <sub>2</sub> emission from different C-cycling activities measured according to the LTO (V: Veluwe, B: Berchida, L: Lancaster) with (A) basal mineralization (R <sub>s</sub> control soil), (B) total mineralization (R <sub>t</sub> ), (C) wheat residues mineralization and (D) Priming Effect.....	88
<b>Supplementary Figure III-S3:</b> Correlation matrix performed on all biotic (grey background) and abiotic parameters (white background) measured in our study.....	88

#### ❖ Chapitre IV

<b>Figure IV-1:</b> Dynamics of bacterial (A and C) and fungal (B and D) richness and evenness during the 12-month experiment in control (full line) and wheat-amended plots (dashed line) for each soil history: grassland (grey) and cropland (black).....	100
<b>Figure IV-2:</b> Non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) ordination plot derived from weighted Pairwise Unifrac distances for (A) bacterial and (B) fungal communities over time according to soil management history: cropland (squares) and grassland (circles).....	100
<b>Figure IV-3:</b> Heat map comparison of bacterial and fungal <i>phyla</i> detected in soils according to land management history (cropland and grassland) and treatments (control or amended) over time.....	101
<b>Figure IV-4:</b> Dynamics of the relative abundance of some bacterial <i>genera</i> over time, according to soil management history (cropland and grassland) and treatment: control (dark grey) and wheat-amended (light grey) .....	102



**Figure IV-5:** Dynamics of the relative abundance of some fungal *genera* over time, according to soil management history (cropland and grassland) and treatment: control (dark grey) and wheat-amended (light grey) ..... 103

**Supplementary Figure IV-1:** Organization of the experimental site set up at the SOERE-ACBB (Lusignan, France). Pictures of the cropland (A), and grassland plot (B) associated with their respective diagrammatic representations (C and D) ..... 109

**Supplementary Figure IV-2:** Changes in the climatic parameters at the site during the 1-year period (01/09/2011 to 13/09/2012). Precipitation (A), soil humidity (black line) and temperature (grey line) (B)..... 110

**Supplementary Figure IV-3:** Heat map comparison of bacterial *genera* (relative abundance > 1%) detected in soils according to land management history (cropland and grassland) and treatments (control or amended) over time ..... 110

**Supplementary Figure IV-4:** Heat map comparison of fungal *genera* (relative abundance > 1%) detected in soils according to land management history (cropland and grassland) and treatments (control or amended) over time ..... 111

## ❖ Chapitre V

**Figure V-1:** Modèles hypothétiques de l'effet de l'application d'un stress sur la diversité des communautés microbiennes ..... 115

## Liste des encarts

### ❖ Chapitre I

**Encadré 1:** L'évaluation des écosystèmes pour le millénaire ..... 16

**Encadré 2:** Stratégies adaptatives chez les êtres vivants..... 28



## Liste des tableaux

### ❖ Chapitre I

**Table I-1:** Estimation du nombre d'espèces de végétaux et d'organismes du sol organisé en fonction de la largeur de leur corps ..... 18

**Table I-2:** Différentes méthodes pour le calcul des indices de résistance et de résilience ..... 38

### ❖ Chapitre II

**Table II-1:** Diversity and density parameters of the microbial communities (bacteria and fungi) for each level of diversity before the application of stress (T0) ..... 52

### ❖ Chapitre III

**Table III-1:** Top soil (0-10 cm layer) physicochemical parameters according to land use management of LTO ..... 78

**Table III-2:** Partitioning of the functional variation of different C-cycling activities measured as a function of biotic and abiotic parameters ..... 81

**Supplementary Table III-1:** Relative abundance (%) of bacterial and fungal phyla in microbial composition according to LTO and land use intensification ..... 87

### ❖ Chapitre IV

**Table IV-1:** Soil physicochemical characteristics according to land use history at T0 ..... 100



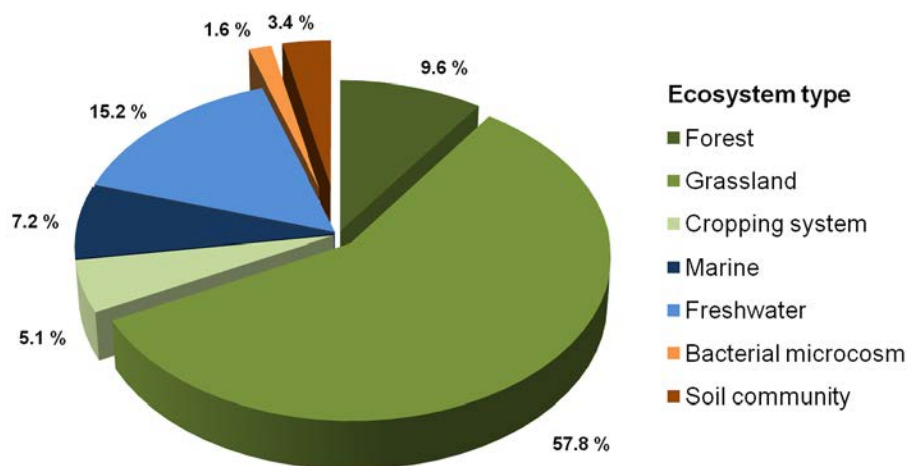


# **Introduction Générale**



Le 20<sup>ème</sup> siècle a marqué le début de transformations majeures des sociétés humaines. Les avancées technologiques ainsi que l'augmentation de la population mondiale ont entraîné une intensification des activités humaines telles que l'agriculture, l'industrialisation et l'urbanisation, et ceci aux dépens de nombreux écosystèmes. Cette intensification s'est traduite par la colonisation de nouveaux espaces naturels et par une exploitation accrue des ressources, passant ainsi de systèmes naturels complexes (réseaux trophiques riches et biodiversité élevée) à des systèmes simplifiés (réseaux trophiques pauvres et faiblement diversifiés), plus facilement gérables et exploitables par les hommes. Cependant, la domination de l'homme sur les écosystèmes a entraîné une diminution drastique de la biodiversité à l'échelle mondiale. Le taux d'extinction des espèces a augmenté d'un facteur 10, 100 voire 1000 depuis l'ère industrielle (MA, 2005) et certains auteurs se réfèrent même au sixième événement majeur d'extinction dans l'histoire de la vie (Chapin *et al.*, 2000; Barnosky *et al.*, 2011). Une telle modification de la diversité pourrait avoir des conséquences majeures sur la capacité des écosystèmes à maintenir les fonctions et services écosystémiques dont l'humanité dépend. Cette préoccupation a été reprise dans le *Millennium Ecosystem Assessment* (MA, 2005). Ce document stratégique initié par différents acteurs (scientifiques, économistes, politiciens, *etc.*) souligne l'importance de préserver les écosystèmes et leur biodiversité en répertoriant l'ensemble des services écosystémiques qu'ils procurent. Aujourd'hui, cette question est devenue centrale et la compréhension de la relation entre la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes a suscité depuis ces 20 dernières années un intérêt croissant dans les sciences environnementales et écologiques (Cardinale *et al.*, 2012).

Le sol est l'un des plus importants réservoirs de biodiversité de notre planète. On estime qu'un gramme de sol abrite plusieurs milliards de bactéries et champignons, avec plus de 1000 espèces différentes (Curtis & Sloan, 2005) et que plusieurs centaines d'espèces faunistiques (protozoaire, nématodes, insectes, vers de terre) vivent également dans un petit volume de sol (quelques cm<sup>3</sup>) (Wu *et al.*, 2009). Cette grande diversité varie en termes de richesse taxonomique, d'abondance et de distribution en fonction du type de sol, des conditions climatiques, de la végétation et de l'utilisation des terres. Le sol occupe également une position centrale dans le fonctionnement de notre système planétaire. A l'interface des quatre autres grands milieux naturels (lithosphère, hydrosphère, atmosphère et biosphère), il est le siège de nombreux processus, contribuant ainsi à un nombre considérable de services écosystémiques. Parmi les services environnementaux, sociaux et économiques identifiés, le sol joue un rôle dans la régulation et la purification de l'eau, le recyclage des éléments

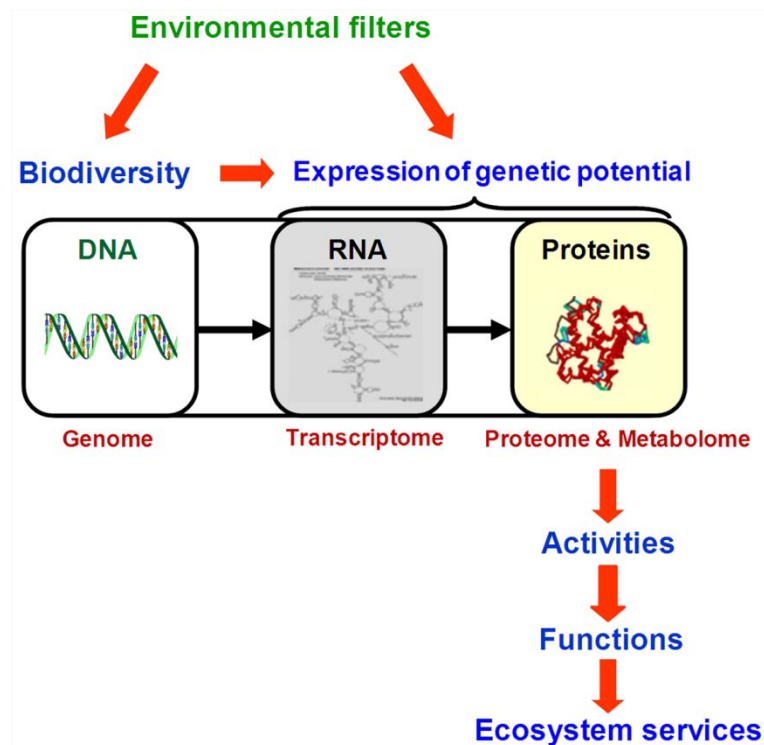


**Figure IG-1:** Distribution des études expérimentales examinant la relation diversité-fonctionnement des écosystèmes selon le type d'écosystèmes étudiés (d'après une méta-analyse réalisée par Balvanera *et al.*, (2006)).

minéraux à travers la dégradation de la matière organique, le stockage du carbone (en agissant comme un puits pour le CO<sub>2</sub> atmosphérique), ce dernier processus étant directement lié aux changements climatiques et à la productivité primaire.

L'ensemble de ces services résulte de la complexité des assemblages taxonomiques et fonctionnels des communautés indigènes et des interactions entre les organismes du sol (Coleman & Whitman, 2005; Barrios, 2007). Toutefois, le nombre d'études portant sur la quantification/caractérisation de la biodiversité du sol et sa traduction en fonctionnement biologique est beaucoup plus faible en comparaison des travaux portant sur la diversité des organismes vivants à sa surface (notamment les végétaux) (Balvanera *et al.*, 2006, Figure IG-1). Par conséquent notre niveau de connaissance reste très limité quant à l'impact des activités humaines sur la biodiversité du sol et les services écosystémiques associés. Cela est encore plus vrai pour les communautés microbiennes du sol, souvent considérées comme des organismes ubiquistes présentant une forte redondance fonctionnelle. A ce titre, les communautés microbiennes du sol sont encore représentées comme une « boîte noire » fonctionnelle génératrice de flux dont l'intensité ne dépend que de facteurs abiotiques comme la température, l'humidité, le pH. En conséquence, l'hypothèse selon laquelle la diversité et la composition des communautés microbiennes ainsi que les interactions trophiques entre les populations (compétition, mutualisme, etc.) pourraient jouer un rôle fonctionnel à été jusqu'ici majoritairement exclue (Gignoux *et al.*, 2001).

Le manque de connaissance sur l'implication de la diversité microbienne dans le fonctionnement biologique du sol s'explique notamment par le fait que l'écologie microbienne est une science jeune qui s'est longtemps heurtée à des difficultés techniques, dues en majeure partie aux caractéristiques des microorganismes et du sol. En effet, les microorganismes, comme leur nom l'indique, sont de taille microscopique (de l'ordre du micromètre pour les bactéries). Leur diversité au sein du sol est immense, et peut compter près d'un million d'espèces de bactéries, archées et champignons pour un gramme de sol (Torsvik & Øvreås, 2002). La grande majorité de ces microorganismes (plus de 90%) ne sont pas cultivables sur des milieux de culture, rendant impossible leur étude par les méthodes de microbiologie pasteurienne traditionnelles. De plus l'hétérogénéité et la complexité physique et chimique de la matrice sol compliquent encore l'accessibilité technique aux microorganismes telluriques. Ces difficultés ont pendant longtemps constitué un frein à la caractérisation de la diversité microbienne du sol. Toutefois, ces obstacles ont motivé des efforts méthodologiques qui se sont accompagnés de progrès majeurs, tels que l'extraction de

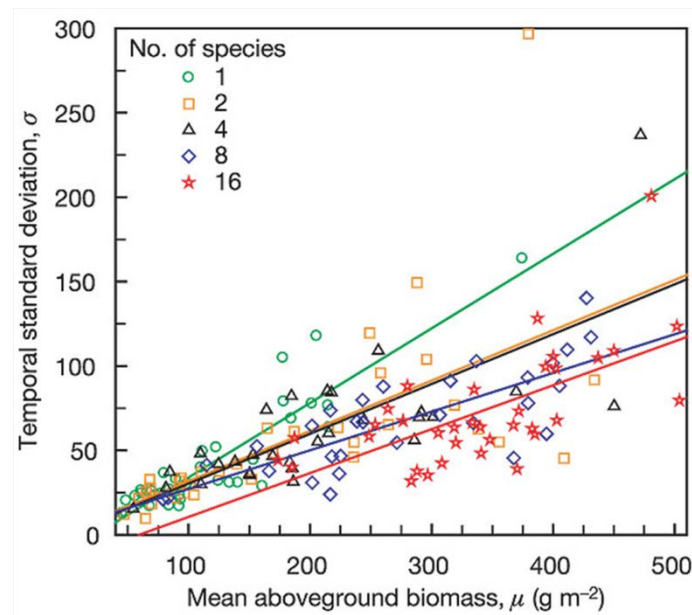


**Figure IG-2:** Représentation schématique de la relation entre diversité, activités, fonctions microbiennes et services écosystémiques délivrés par les sols. Les filtres environnementaux ont un impact sur la diversité et l'expression du potentiel génétique des communautés microbiennes (schéma modifié d'après Maron *et al.*, (2007)).

l'ADN des sols, sa quantification, l'analyse de son polymorphisme permettant ainsi d'avoir une vision beaucoup plus exhaustive des communautés microbiennes telluriques. Aujourd'hui, ces avancées technologiques offrent de nouvelles opportunités pour la communauté scientifique et permettent notamment de progresser dans la réponse aux enjeux majeurs des recherches en écologie microbienne des sols. Ces enjeux sont (i) de mieux connaître la biodiversité des sols, (ii) d'évaluer les relations entre biodiversité, fonctions et services écosystémiques, et (iii) de déterminer l'impact des conditions environnementales sur la diversité et le fonctionnement biologique des sols (Figure IG-2).

Comme évoqué précédemment, la très grande majorité des travaux de la littérature traitant de l'effet de la diversité sur le fonctionnement des écosystèmes est basée sur la manipulation de la diversité végétale (diversité taxonomique et/ou fonctionnelle) (Balvanera *et al.*, 2006). Ceci s'explique par le fait que (i) d'un point de vue écologique les plantes représentent, en tant que producteurs primaires, la composante basale des écosystèmes terrestres, et (ii) d'un point de vue pratique, il est très facile de manipuler la diversité de ces organismes. Les premières études manipulant la diversité des plantes remontent à 1843 avec les expérimentations réalisées sur les systèmes prairiaux de la station expérimentale anglaise de Rothamsted (Lawes *et al.*, 1882). Cet historique très long explique l'abondante littérature disponible sur ce sujet à l'heure actuelle. L'ensemble de ces études a permis l'élaboration d'un panel de concepts théoriques majeurs permettant de mieux comprendre comment la diversité peut influencer le fonctionnement des écosystèmes (Loreau *et al.*, 2001). Même si les résultats sont parfois contradictoires, il est globalement clair que la diversité des végétaux a un effet positif sur le fonctionnement des écosystèmes, leurs performances, leur stabilité et par conséquent leurs capacités à fournir des services écosystémiques (Balvanera *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2012; Hooper *et al.*, 2012). Les études de Tilman *et al.*, (1996, 1997, 2006) sont une bonne illustration des relations positives entre la diversité, la stabilité et le fonctionnement des écosystèmes (Figure IG-3). Dans leurs travaux, ces auteurs ont démontré dans des systèmes de prairie que la productivité primaire était plus importante pour les communautés végétales riches en espèces, ceci notamment grâce à une meilleure exploitation des ressources du sol et une meilleure couverture végétale. Par ailleurs, ils ont démontré que les communautés végétales les plus diverses étaient beaucoup plus stables dans le temps et résistaient mieux à des événements climatiques extrêmes tels que des épisodes de sécheresse.





**Figure IG-3:** Effet de la diversité végétale dans les systèmes de prairies sur la relation entre la biomasse moyenne et sa variabilité temporelle. Chaque point représente la biomasse d'une parcelle de prairie et sa variabilité temporelle basé sur cinq échantillons annuels recueillies de 2001 à 2005. Ces résultats montrent que les traitements à forte diversité d'espèces ont une biomasse plus élevée (meilleure productivité) et moins variable dans le temps (meilleure stabilité). (Tilman *et al.*, 2006)

Pour les communautés microbiennes du sol, la question du rôle de la diversité pour la stabilité et le fonctionnement biologique du sol reste ouverte car peu de travaux l'ont réellement appréhendée directement (en raison notamment des limitations méthodologiques évoquées précédemment). Les premiers travaux examinant la relation diversité-stabilité (D-S) pour les communautés microbiennes du sol ont été initiés par Griffiths et collaborateurs (2000), qui ont examiné la réponse de l'activité des communautés microbiennes à différentes perturbations (transitoires ou rémanentes). Ces auteurs ont démontré un lien positif puisque les activités des communautés microbiennes pour les sols les moins diversifiés étaient moins stables (en termes de résistance et résilience) lorsqu'ils étaient soumis aux différentes perturbations. Depuis, d'autres travaux ont testé l'influence de la diversité microbienne sur la stabilité populationnelle et/ou sur la stabilité des activités des communautés microbiennes en réponse à différents types de perturbations (Degens *et al.*, 2001; Girvan *et al.*, 2005; Wertz *et al.*, 2007). Cependant, nos connaissances dans ce domaine restent limitées puisque les résultats des quelques études disponibles ne font pas apparaître de consensus, variant entre des relations D-S positives ou neutres (Deng, 2012).

Il en va de même pour la compréhension du lien entre la diversité microbienne et les activités des communautés microbiennes liées au fonctionnement biologique du sol (e.g. cycle du carbone, de l'azote, etc.). Dans le cadre de l'expérimentation conduite sur les systèmes prairiaux de Jasper Ridge (Californie), Horz *et al.*, (2004) ont montré qu'une modification de la diversité de la communauté nitrifiante du sol en réponse aux changements globaux peut entraîner une augmentation de la nitrification, illustrant ainsi que la diversité microbienne joue un rôle important dans le cycle de l'azote. Ces observations sont en accord avec les travaux de Philippot *et al.*, (2013) qui ont récemment démontré qu'une réduction de la diversité des communautés dénitrifiantes diminue significativement les émissions de N<sub>2</sub>O du sol. A l'inverse, les études actuelles examinant l'implication de la diversité microbienne dans le cycle du carbone ne permettent pas d'établir un tel lien (Nielsen *et al.*, 2011). Par exemple, les travaux de Griffiths *et al.*, (2001; 2004) montrent qu'il n'existe aucune relation entre le niveau de diversité microbienne du sol et les activités liées au cycle du carbone (e.g. la minéralisation du carbone du sol ou le taux de décomposition d'un substrat carboné). Une des raisons souvent proposée par les auteurs est que la décomposition de la matière organique est une fonction fortement redondante au sein des communautés microbiennes telluriques (Nannipieri *et al.*, 2003). Pourtant, l'analyse des capacités enzymatiques nécessaire à la dégradation des matières organiques révèle qu'elles ne sont pas uniformément réparties au



sein de la communauté microbienne (Hu & van Bruggen, 1997), en particulier celles impliquées dans les étapes finales de dégradation et qui sont portées par un nombre relativement réduit de microorganismes (de Boer *et al.*, 2005). Cela pourrait expliquer les successions de populations microbiennes observées pendant la décomposition des résidus végétaux apportés au sol (Bernard *et al.*, 2009; Pascault *et al.*, 2010; 2013), et suggère que différentes populations microbiennes sont nécessaires pour assurer les étapes de décomposition de la matière organique du sol. En conséquence, comme pour la stabilité, la question du lien entre la diversité microbienne et le cycle du carbone est encore aujourd'hui une question ouverte.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse est de progresser dans la compréhension du lien entre la diversité microbienne et (i) la stabilité structurale et fonctionnelle des communautés, et (ii) l'intensité des transformations de la matière organique dans le sol. L'intérêt d'examiner le cycle du carbone est que (i) les microorganismes du sol, en raison de leurs fortes capacités enzymatiques, sont les principaux décomposeurs de la matière organique, et que (ii) la matière organique est au centre du fonctionnement biologique du sol et par conséquent fortement liée aux services écosystémiques. En effet, la matière organique du sol lie les particules minérales, maintient la structure du sol, réduit l'érosion, augmente la capacité de rétention en eau et agit comme une source d'énergie, de nutriment et d'habitats pour les organismes du sol (Viaud *et al.*, 2010; Garcia-Pausas & Paterson, 2011). En rapport direct avec les activités humaines, la matière organique est primordiale puisqu'elle agit comme un « magasin dynamique » de carbone et de nutriments qui sont essentiels pour la fertilité et la productivité agricole.

Plus précisément nos enjeux sont :

- de tester si la diversité microbienne d'un sol peut représenter une « assurance écologique » pour la stabilité des communautés lorsque le sol est soumis à différentes perturbations,
- d'évaluer le rôle de la diversité microbienne (richesse, composition) dans le turnover de la matière organique.

La stratégie retenue pour ce travail de thèse est basée sur des expérimentations au laboratoire, en conditions contrôlées ; et *in situ*, sur des sites expérimentaux (nationaux et Européens). Cette stratégie est justifiée par la complémentarité de ces deux approches. Les expérimentations en microcosmes permettent de travailler dans des conditions optimisées et



simplifiées pour ne faire varier que le paramètre à tester (la diversité microbienne). Les expérimentations au champ permettent d'intégrer la variabilité des paramètres pédoclimatiques.

Ce manuscrit est articulé autour de cinq chapitres :

❖ ***Le premier chapitre*** présente une synthèse bibliographique donnant les bases nécessaires à la compréhension des travaux présentés dans le manuscrit. Après une brève description du sol, cette partie présente les communautés microbiennes telluriques, les méthodes pour les caractériser ainsi qu'un état de l'art sur les premières études et les concepts impliquant la diversité microbienne dans la stabilité et le turnover de la matière organique du sol.

❖ ***Le deuxième chapitre*** correspond à une expérimentation de laboratoire basée sur une manipulation (érosion) de la diversité microbienne du sol pour évaluer l'influence de la diversité des communautés microbiennes sur le fonctionnement et la stabilité des communautés (résistance/résilience) en réponse à deux types de stress. Dans cette étude, nous émettons l'hypothèse que (i) la stabilité des communautés sera plus importante à un niveau de diversité microbienne élevé, et que (ii) l'effet de la diversité dans la réponse des communautés microbiennes sera dépendant de la nature de la perturbation appliquée. Ce chapitre sera présenté sous la forme d'un article scientifique qui a été publié dans le journal *Environmental Microbiology Reports*.

❖ ***Le troisième chapitre*** est une expérimentation en microcosme visant à caractériser l'influence d'un gradient d'intensification de l'utilisation des terres sur la diversité microbienne et le turnover de la matière organique du sol. Dans ce chapitre, notre hypothèse de travail est que les pratiques agricoles peuvent constituer un « levier » agronomique pour augmenter ou diminuer la diversité microbienne d'un sol et que cette modification pourrait avoir des effets significatifs sur le processus de décomposition de la matière organique du sol. Cette expérience s'appuie sur trois sites expérimentaux européens (Sardaigne, Angleterre et Hollande) représentant trois gradients d'intensification d'usage du sol différents. Ce chapitre sera présenté sous la forme d'un article scientifique en vue d'une soumission dans la revue *The ISME Journal*.

❖ ***Le quatrième chapitre*** correspond à une expérimentation de terrain mise en place sur le site de l'observatoire de recherches en environnement de Lusignan (France) pour évaluer *in situ* comment l'historique cultural du sol (prairie vs culture) peut altérer la réponse de la diversité et de l'activité des communautés microbienne à un apport de paille de blé. Dans



cette étude nos hypothèses sont que (i) l'historique cultural est un driver important des communautés microbiennes en termes de diversité et de composition, et que (ii) ces modifications de diversité induites par l'historique cultural ont des répercussions importantes sur la dynamique des communautés microbiennes. Ce chapitre sera présenté sous la forme d'un article scientifique soumis dans la revue *Microbial Biotechnology*.

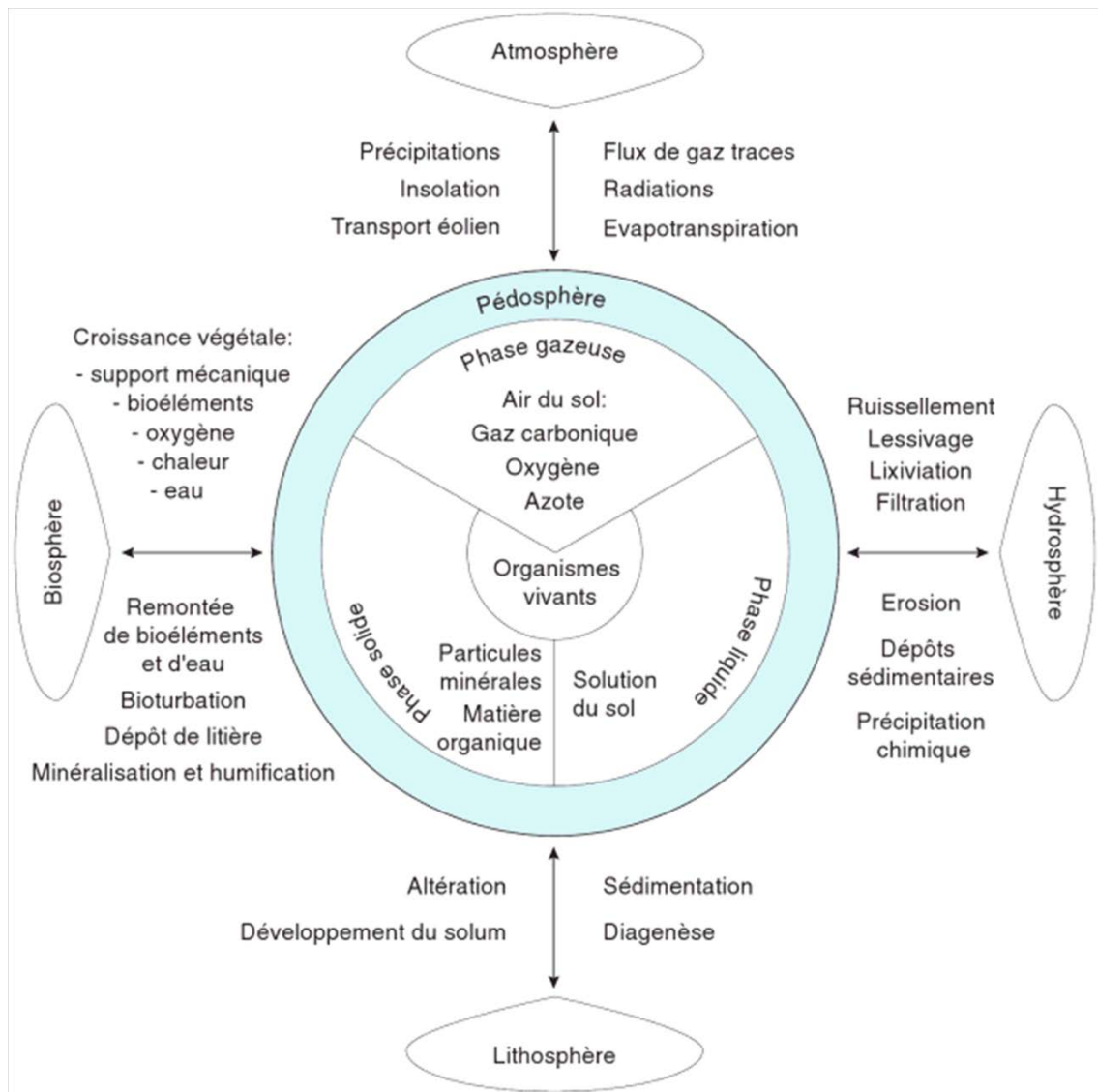
❖ *Le cinquième chapitre* de ce manuscrit présente les principaux résultats et conclusions de ces trois expérimentations, ainsi que les perspectives de ces travaux replacées dans un contexte de recherche scientifique sur la relation entre la diversité microbienne et le fonctionnement biologique des sols.





# **Chapitre I:**

## **Synthèse Bibliographique**



**Figure I-1:** La complexité externe et interne du sol. (Gobat *et al.*, 2010)

---

## **LA DIVERSITE MICROBIENNE TELLURIQUE ET SON IMPLICATION DANS LES SERVICES ECOSYSTEMIQUES: STABILITE ET TURNOVER DE LA MATIERE ORGANIQUE DU SOL**

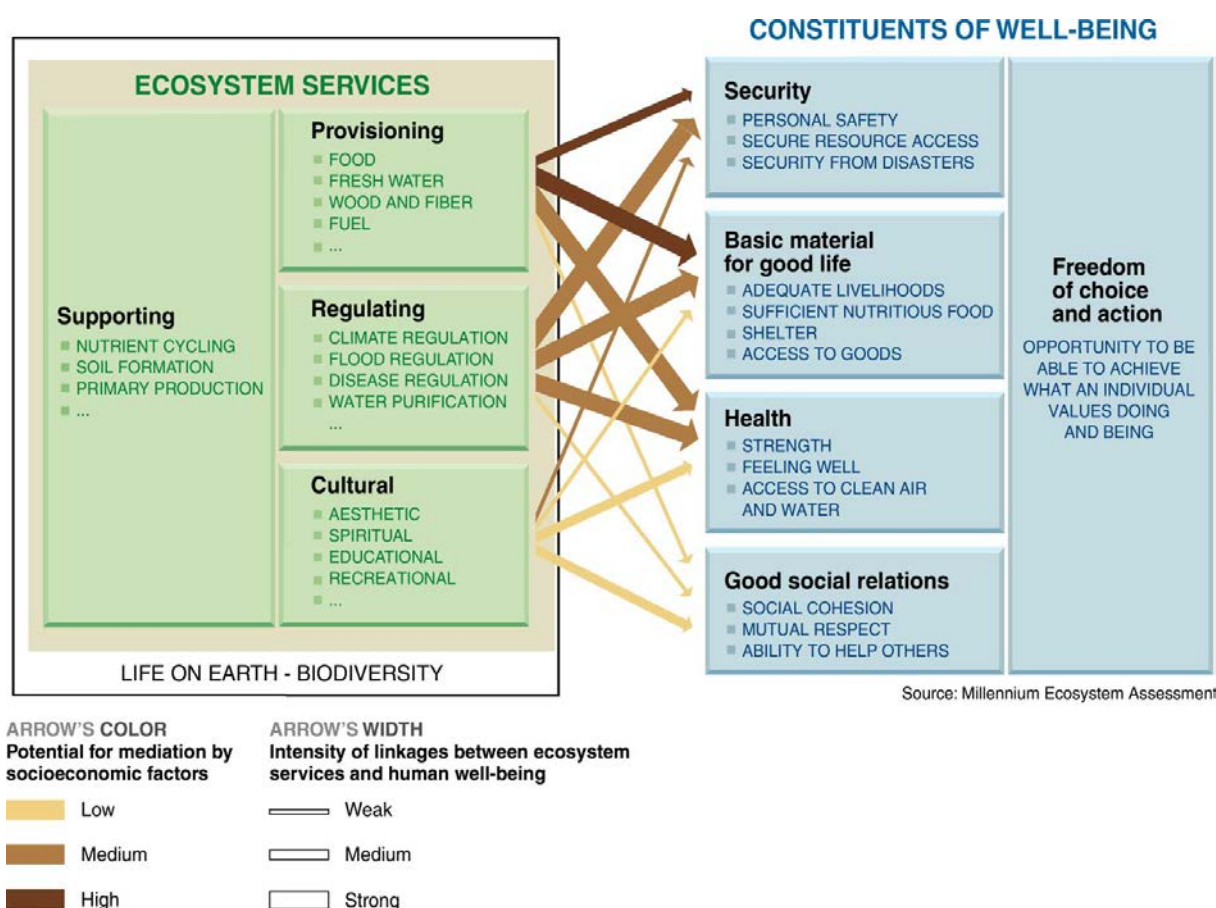
---

### **1- Qu'est ce que le sol ?**

Le sol est la couche superficielle et meuble de l'écorce terrestre qui s'étend verticalement de la roche altérée jusqu'à la surface et dont l'épaisseur varie généralement de quelques centimètres à quelques mètres. Horizontalement, il s'étend de façon presque continue à la surface des continents, seulement interrompu par les affleurements rocheux, les cours d'eau et les constructions de l'homme (Bruand, 2009). Le sol est ainsi considéré comme un volume (pédosphère) à l'interface de 4 autres grands milieux naturels de la planète : la lithosphère, l'hydrosphère, l'atmosphère et la biosphère (Figure I-1). De par sa position centrale, le sol participe à de nombreuses fonctions environnementales. Il est notamment un lieu de stockage et de transformation des matières organiques et minérales, jouant ainsi le rôle de régulateur des échanges et des flux de carbone dans les écosystèmes. En rapport direct avec l'homme, le sol fournit alimentation, fibres et combustibles ainsi que de nombreux autres services écosystémiques indispensables aux sociétés humaines. Enfin le sol constitue un support pour les êtres vivants et abrite une biodiversité très élevée.

### **Encadré 1 : L'évaluation des écosystèmes pour le millénaire**

L'évaluation des écosystèmes pour le millénaire (en anglais MAE) est un programme de travail international initié en 2000 à la demande du secrétaire général des Nations Unies, Kofi Annan. Instaurée en 2001, ce programme a pour objectif d'évaluer les conséquences des changements que subissent les écosystèmes pour le bien être humain. Il doit également établir la base scientifique pour mettre en œuvre les actions nécessaires à l'amélioration de la conservation et de l'utilisation durable de ces systèmes, ainsi que de leur contribution au bien-être humain. Plus de 1360 experts du monde entier ont participé à ce projet. Leurs conclusions, réunies en 5 volumes techniques et 6 rapports de synthèse, présentent une évaluation scientifique de la condition et des tendances des écosystèmes dans le monde et de leurs fonctions (comme l'eau potable, la nourriture, les produits forestier, etc.), ainsi que les possibilités de restaurer, de conserver ou d'améliorer l'utilisation durable des écosystèmes. (Source: <http://www.millenniumassessment.org>)



**Figure I-2:** Liens entre les services écosystémiques et le Bien-être de l'Homme. Cette figure donne une liste non exhaustive des services fournis par les écosystèmes et les différentes composantes du bien-être qui en résultent (Source: *Millenium Ecosystem Assessment*).

### 1.1- Une mine de services écosystémiques

De par les multiples fonctions qu'il porte, le sol fournit une grande variété de services écosystémiques, définis comme des bénéfices délivrés par les écosystèmes aux sociétés humaines (Daily *et al.*, 1997; MA, 2005). Ce concept de services écosystémiques apparaît dans les années 1970 et devient un important champ d'investigation depuis ces dix dernières années (Fisher *et al.*, 2009), notamment grâce à la publication du *Millenium Ecosystem Assessment* (MA) (Encadre I-1). Depuis, plusieurs travaux ont tenté d'identifier les services écosystémiques délivrés spécifiquement par le sol en se basant majoritairement sur les agro-écosystèmes (Lavelle *et al.*, 2006; Barrios, 2007; Brussaard *et al.*, 2007; Blouin *et al.*, 2013), mais aussi sur les sols naturels (Daily *et al.*, 1997). Sur la base de la classification des services réalisée par le MA et de la littérature existante, les services écosystémiques du sol peuvent être répartis en 4 grands types de services (Figure I-2):

- *Les services de support* qui supportent le fonctionnement de l'écosystème et l'ensemble des autres services écosystémiques, à travers le cycle des nutriments et de l'eau, la production primaire et la formation du sol...
- *Les services d'approvisionnements* qui fournissent des produits tels que l'alimentation, l'eau potable et les matériaux bruts...
- *Les services de régulations* qui régulent au sein des écosystèmes le climat, l'érosion, la dépollution...
- *Les services culturels* qui correspondent aux bénéfices non-matériels apportés aux sociétés humaines comme les valeurs religieuses, culturelles ou encore esthétiques.

L'ensemble des services identifiés montre que le sol est un élément vital pour le fonctionnement global des écosystèmes et des sociétés humaines. L'autre point important qui ressort de ces travaux est le lien fort qui existe entre la composante biologique du sol et les services écosystémiques, puisque l'ensemble des processus dépend fortement des organismes habitants dans le sol (Barrios, 2007; Brussaard *et al.*, 2007).

### 1.2- Une matrice complexe, hétérogène mais structurée

La formation du sol est lente et résulte de l'altération de la roche mère enrichie par des apports de matière organique sous l'influence du climat, de la végétation, du relief, de la géomorphologie et de l'activité biologique. Au niveau de sa composition, le sol est une matrice complexe représentée par (Figure I-1) :



- Une phase liquide enrichie en ions et en molécules minérales et organiques, appelée solution du sol où siègent de nombreux processus,
- une phase gazeuse occupant les pores abandonnés par l'eau lors de son retrait où se mélangent différents gaz provenant des réactions chimiques et de l'atmosphère,
- une phase solide constituée de particules minérales de taille et de nature différentes et de constituants organiques allant de fragments de végétaux ou d'animaux à des macromolécules organiques complexes.








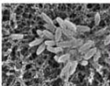
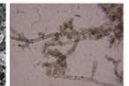
Parmi les éléments constitutifs du sol, la matière organique est importante dans l'édification de cette matrice et peut représenter 1 à 10 % de la masse des sols. La Matière Organique du Sol (MOS) peut être considérée comme l'ensemble des constituants organiques morts, d'origine végétale, animale ou microbienne, transformés ou non (Manlay *et al.*, 2007). Elle est constituée de différentes fractions représentées par (i) la Matière Organique Fraîche (MOF) composée de débris d'origine végétale (résidus végétaux, exsudats) et animale (déjections, cadavres), (ii) les composés organiques intermédiaires, appelés « matières organiques transitoires », provenant de la transformation de la MOF, et (iii) les matières humiques ou humus, provenant de l'évolution des matières précédentes. Cette dernière partie représente à elle seule 70 à 90 % de la matière organique totale et constitue un stock de carbone important dans les sols (Arrouays *et al.*, 2002). La complexité multiphasique du sol et de la MOS ainsi que les variabilités de texture (composition granulométrique) et de structure (mode d'assemblage des constituants minéraux et organiques) confèrent au sol une forte hétérogénéité à petite comme à grande échelle (Dequiedt *et al.*, 2011; Ranjard *et al.*, 2013). L'organisation qui en résulte permet l'existence d'une mosaïque de micro- et macro-environnements (agrégat, motte, parcelle, champ, paysage...) différents en termes de caractéristiques physico-chimiques et structurales qui représentent une multitude d'habitats pour les organismes indigènes (Girard *et al.*, 2005; Bruand, 2009).

### **1.3- Un réservoir de biodiversité**

Le sol héberge l'une des communautés biologiques les plus complexes et diversifiées que l'on peut rencontrer sur terre. Par exemple, on estime qu'il y a 260 millions d'organismes en moyenne dans 1 m<sup>2</sup> de sol de prairie permanente et que 1 hectare de sol forestier compte plus d'organismes vivants que d'être humains sur terre (Gobat *et al.*, 1998). Cette immense diversité s'explique en partie par la forte hétérogénéité physique et chimique du sol, aux caractéristiques microclimatiques et à la phénologie des organismes qui, ensemble, conduisent



**Table I-1:** Estimation du nombre d'espèces de végétaux et d'organismes du sol organisé en fonction de la largeur de leur corps (modifié à partir de Barrios, 2007)

Size	Group		Know species	Estimated total species	% Know	
	Vascular plants		270.000	300.000	90	
	Macrofauna					
	0.5 - 50 mm		Ants	8800	15.000	58,7
			Termites	1600	3000	53,3
			Earthworms	3600	No estimate	No estimate
	Mesofauna					
	0.08 - 2 mm		Mites	20.000 – 30.000	900.000	2,2 – 3,3
			Collembola	6500	24.000	27,1
	Microfauna					
	5 - 120 µm		Protozoa	1500	200.000	7,5
			Nematodes	5000	400.000	1,3
	Microflora					
	1 - 100 µm		Bacteria	13000	1.000.000	1
			Fungi	18.000 – 35.000	1.500.000	1 – 2

au développement et au maintien d'un nombre important de niches écologiques (Ettema & Wardle, 2002).

Au sein de cet écosystème, les organismes ont été classés sur la base de leur taille et sont représentés par 4 groupes incluant la microflore (1-100  $\mu\text{m}$ ), la microfaune (5-120  $\mu\text{m}$ ), la mésofaune (80  $\mu\text{m}$ -2 mm), et la macrofaune (500  $\mu\text{m}$ -50 mm) (Table I-1). Malgré une classification des organismes du sol bien définie par la communauté scientifique, l'inventaire des espèces a été considérablement limité par rapport aux organismes vivant au dessus du sol comme les végétaux (Table I-1). Ceci est particulièrement vrai pour les organismes de petite taille (bactéries et champignons) dont les espèces connues représentent environ 1% du nombre total d'espèces présent dans le sol (Torsvik & Øvreås 2002). Le manque de connaissances sur la diversité de la microflore du sol est essentiellement dû à des difficultés techniques. Toutefois avec le développement et l'augmentation de l'utilisation de techniques moléculaires que nous détaillerons plus loin, notre connaissance de la diversité des communautés microbiennes du sol a augmenté considérablement depuis ces dernières années.



## **2- Les communautés microbiennes du sol**

Les communautés microbiennes du sol représentent la plus grande diversité que l'on rencontre sur terre. Avec une biomasse microbienne estimée de 1 tonne à 10 tonnes par hectare, elles représentent également une fraction considérable de la biomasse vivante sur terre (Fierer *et al.*, 2007). La diversité des communautés microbiennes telluriques est complexe et variable à différents niveaux d'organisation biologique. Elle englobe la variabilité génétique au sein des taxons (espèces), le nombre (richesse) et l'abondance relative des taxons (evenness) ainsi que les groupes fonctionnels au sein de la communauté (Torsvik & Øvreås, 2002).

### **2.1- Un rôle majeur dans le fonctionnement biologique du sol**

L'énorme diversité taxonomique et génétique des microorganismes du sol se traduit par une implication forte dans les services écosystémiques assurés par le sol et présentés en section I-1 (Figure I-2). Ainsi, les communautés microbiennes du sol participent activement aux services de soutien du sol, notamment à travers leur rôle dans les cycles biogéochimiques d'éléments majeurs tels que le carbone, le phosphore, le soufre et l'azote... Au niveau de ce dernier, l'implication forte de la composante microbienne dans la fixation de l'azote atmosphérique, l'ammonification, la nitrification et de dénitrification n'est plus à démontrer (Hayatsu *et al.*, 2008). De même, la minéralisation de la matière organique, processus central du cycle du carbone, se réalise en grande partie par les microorganismes hétérotrophes du sol qui réduisent des molécules complexes en molécules plus petites, facilement assimilables par les plantes. De par leur plasticité métabolique, les microorganismes telluriques interviennent aussi dans la dégradation et l'immobilisation de polluants (ETM, pesticides...) apportés en milieu agricole ou industriel. Certains microorganismes ont également un impact important sur la santé et la croissance des plantes en réalisant des symbioses (Barrios, 2007) ou en induisant des maladies. D'autres sont impliqués dans la formation et la stabilité des agrégats du sol *via* la production d'agents liants ou l'établissement de liaisons physiques réalisées par les hyphes des champignons (Six *et al.*, 2002; Le Guillou *et al.*, 2012).

### **2.2- Une distribution hétérogène de la diversité et de l'activité microbienne**

En raison de l'hétérogénéité de la matrice sol en termes de propriétés physicochimiques et de répartition des ressources carbonées (section I-2), la distribution de la diversité et de l'activité des communautés microbiennes, principalement composées



d'organismes hétérotrophes, est elle aussi hétérogène et se concentre dans des zones particulières du sol également appelées « hots spots ». Ces zones de haute activité biologique correspondent au volume de sol influencé par la présence de composés organiques (substrat lui-même et zone de sol dans l'environnement proche du substrat). Actuellement, trois principaux hots spots peuvent être différenciés:

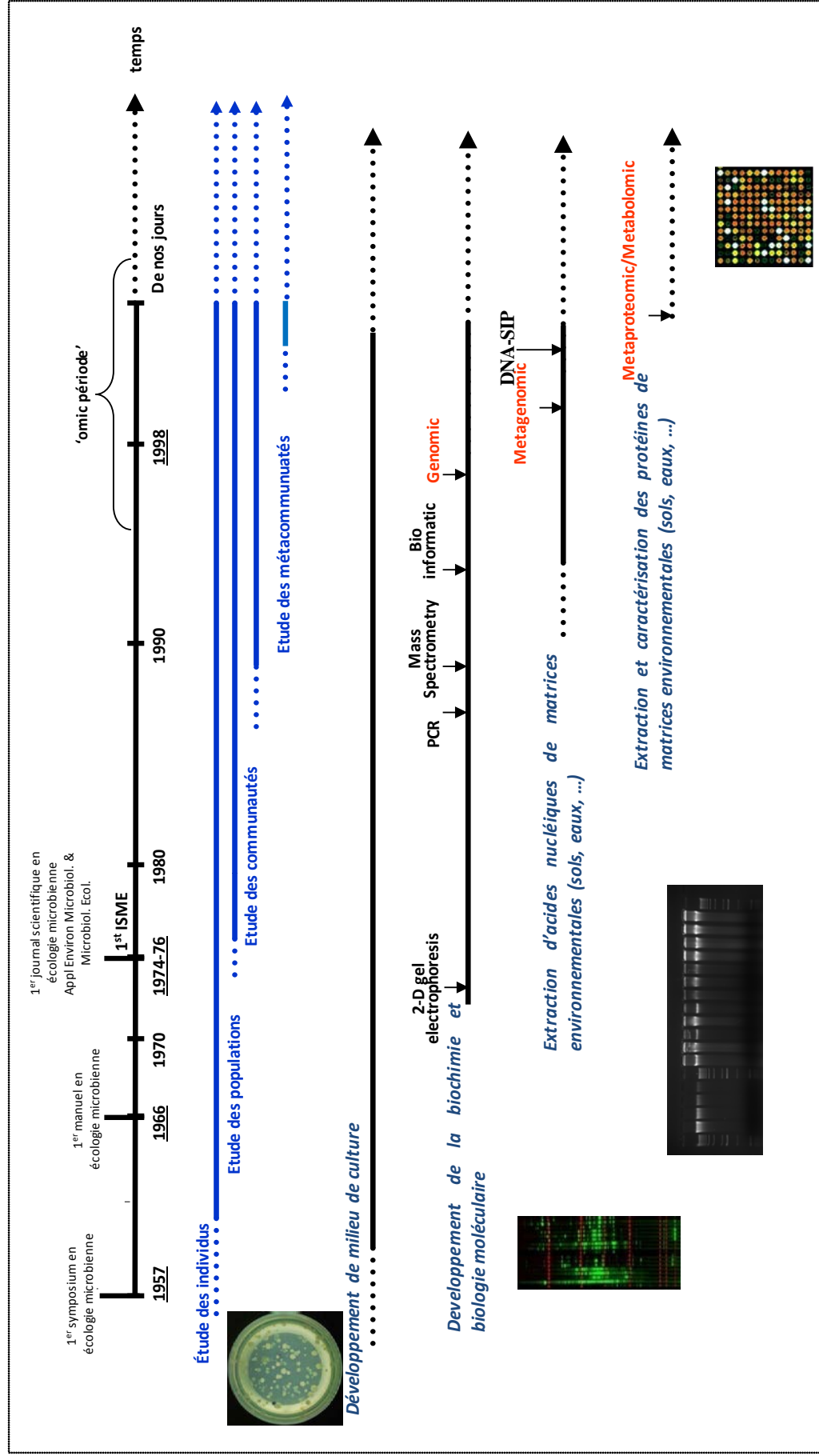
- la détritosphère : zone du sol sous l'influence de la litière composée de détritux de végétaux et d'animaux (Gaillard *et al.*, 1999),
- la drilosphère : zone influencée par les lombriciens, recouverte de mucilages et d'autres excréments riches en carbone et nutriments,
- la rhizosphère : zone du sol directement influencée par les racines et leurs exsudats.

Ces zones ont été identifiées selon leur origine et leur importance dans les processus et les fonctions régulatrices majeures du sol comme l'agrégation, la décomposition de la matière organique, les cycles des nutriments, l'activité microbienne et la productivité des plantes (Beare *et al.*, 1995). Comme l'entrée de carbone dans le sol se réalise principalement à travers la libération de composés organiques par les racines des plantes appelée « rhizodéposition » (Nguyen, 2003) et par le retour au sol de la biomasse végétale morte, la rhizosphère et la détritosphère représentent deux des principaux hot-spots du sol.

### **2.3- Outils de caractérisation de la communauté microbienne du sol**

La compréhension des mécanismes microbiens impliqués dans la régulation des processus à la base des services rendus par le sol est un enjeu des études en écologie microbienne. Pour répondre à ce challenge, il est nécessaire de pouvoir accéder sur le plan méthodologique aux différentes composantes des communautés que sont la densité, la diversité, la fonctionnalité et l'activité et de déterminer la régulation de chacune par des modifications des conditions environnementales.

L'écologie microbienne du sol est une science relativement jeune (environ 50 ans) qui s'est longtemps heurtée à des difficultés méthodologiques considérables pour caractériser les communautés microbiennes indigènes. Ce retard s'explique en partie par les caractéristiques des microorganismes et par celles des sols. La petite taille des microorganismes, le manque de distinction morphologique, la plasticité des génomes et l'immense diversité génétique et métabolique compliquent la définition d'une espèce (Garland & Lehman, 1999; Torsvik & Øvreås, 2002). De plus, la forte hétérogénéité du sol rend difficile l'accès à cette composante biotique (Maron *et al.*, 2011). L'analyse de l'historique et des récents progrès en écologie



**Figure I-3:** Principales étapes du développement de l'écologie microbienne (d'après Maron *et al.*, 2007).

microbienne montre une évolution par « sauts successifs » représentés par des développements méthodologiques majeurs (Maron *et al.*, 2007, Figure I-3). Au commencement, la diversité des microorganismes du sol a été étudiée *via* des méthodes basées sur l'isolement et la mise en culture des microorganismes. Toutefois ces techniques sont connues pour être sélectives et ne sont donc pas représentatives de l'ensemble des communautés microbiennes puisqu'il est maintenant reconnu qu'environ 90% des microorganismes ne sont pas cultivables (Amann *et al.*, 1995). Face à cette importante limitation, Pace *et al.*, (1986) ont introduit une approche indépendante de la culture basée sur l'extraction et la caractérisation de l'ADN directement à partir des environnements naturels. A partir de ces premiers travaux, de nombreux efforts ont été consacrés au développement de méthodes moléculaires pour caractériser *in situ* et sans *a priori* les informations microbiennes contenues dans les acides nucléiques extraits de différents environnements (sols, air, eaux, *etc.*). Ces développements ont permis la caractérisation de l'abondance, de la structure et de la diversité des communautés microbiennes dans de multiples situations (Ranjard *et al.*, 2000; Maron *et al.*, 2007). Avec le développement de ces approches dites « d'écologie moléculaire », le nombre d'études portant sur la caractérisation des communautés microbiennes dans divers environnements ou soumis à différentes perturbations a augmenté de façon exponentielle (Morris *et al.*, 2002). A la suite de cette section nous présenterons quelques une de ces approches moléculaires qui permettent d'appréhender les communautés microbiennes telluriques de manière quantitative, qualitative et fonctionnelle. Ce sont également ces approches que j'ai utilisées dans mes travaux de thèse.

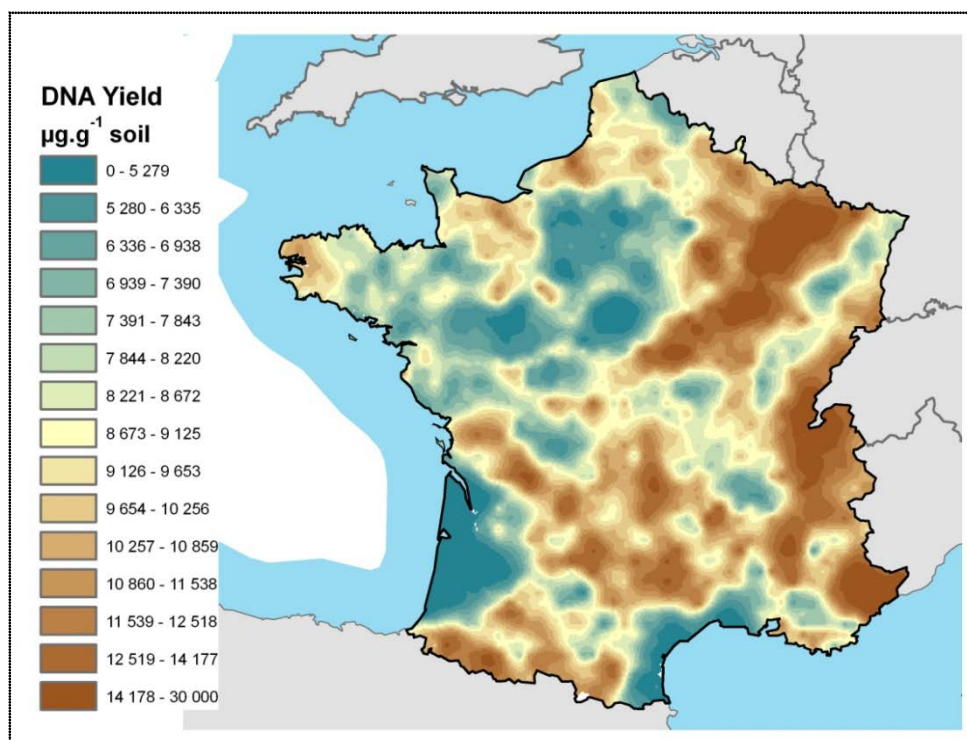
### 2.3.1- Quantification des communautés microbiennes telluriques

L'analyse de l'abondance ou de la biomasse microbienne est une mesure couramment utilisée en écologie microbienne. Elle est reconnue pour être un bon marqueur du fonctionnement biologique des sols (Schloter *et al.*, 2003; Gonzales-Quñones *et al.*, 2011) et a été longtemps utilisée afin d'évaluer l'impact de différentes perturbations sur les agro-écosystèmes (Ranjard *et al.*, 2006). La biomasse microbienne est également une information importante dans la modélisation des processus biologiques liés aux cycles du carbone et de l'azote puisqu'elle est fortement liée à l'intensité des flux (respiration du sol, minéralisation de l'azote) (Colman & Schimel, 2013).

#### ❖ Estimation de la biomasse microbienne

Le terme « biomasse microbienne » a été initialement proposé par Jenkinson (1966) et fait référence à la fraction vivante de la matière organique, considérant l'ensemble des





**Figure I-4:** Répartition géographique de la quantité d'ADN à l'échelle de la France (Dequiedt *et al.*, 2011).

microorganismes du sol. Les premières méthodes permettant l'analyse de la biomasse microbienne se sont basées sur la quantification du carbone d'origine microbien provenant du sol (Martens, 1995). Parmi celles-ci, la méthode d'extraction-fumigation est la plus communément utilisée en écologie microbienne du sol. Cette méthode, développée par Vance *et al.*, (1987), consiste à détruire les microorganismes du sol par fumigation au chloroforme, libérant ainsi leurs composés organiques sous forme soluble. La quantité de carbone microbien est alors calculée en retirant la quantité de carbone soluble dosée avant fumigation à celle obtenue après fumigation. Cette méthode est actuellement normalisée. Toutefois, même si elle a longtemps été utilisée comme référence pour la quantification des microorganismes du sol, elle est aujourd'hui controversée. Il n'a en effet jamais été prouvé que le carbone solubilisé par le chloroforme provient uniquement de la biomasse microbienne (Jenkinson *et al.*, 2004). De plus, tous les microorganismes du sol ne sont pas détruits en 24 heures de fumigation, (Griffiths *et al.*, 2000; 2001). Pour palier à ces biais, d'autres méthodes basées sur l'extraction et la quantification de l'ADN microbien du sol ont été développées.

La biomasse des communautés microbiennes totales d'un sol peut ainsi être estimée à partir de la biomasse moléculaire. Celle-ci est déterminée par la quantification des extraits d'ADN du sol et montre une forte corrélation avec la biomasse microbienne mesurée par la technique de fumigation-extraction (Marstorp *et al.*, 2000; Leckie *et al.*, 2004). Cette méthode permet de s'affranchir des biais inhérents aux techniques traditionnelles évoquées ci-dessus et offre une meilleure praticité pour l'analyse d'un grand jeu d'échantillons. Par exemple, dans les travaux de Dequiedt *et al.*, (2011), elle a permis d'analyser l'abondance microbienne sur 2150 sols prélevés sur l'ensemble du territoire français (Figure I-4). Ces auteurs ont démontré notamment, que la distribution de la biomasse microbienne à l'échelle du territoire français était fortement influencée par le type de sol et son utilisation. En revanche, comme pour les méthodes traditionnelles, l'estimation de la biomasse par la quantification de l'ADN extrait du sol manque de résolution, puisqu'elle prend en compte l'ensemble des microorganismes (vivants ou non) et ne permet pas de faire la différence entre les grands groupes de microorganismes (bactéries, champignons, *archaea*).

#### ❖ Estimation de la densité microbienne par PCR quantitative

Afin d'avoir une meilleure connaissance des acteurs composant la biomasse microbienne, il est possible à partir de l'ADN extrait du sol de déterminer le nombre de copies d'un gène par la méthode de PCR quantitative. Ainsi l'utilisation d'amorces universelles ou



spécifiques permet de cibler et quantifier les communautés de bactéries et de champignons d'un sol (Plassart *et al.*, 2012), ou certains groupes taxonomiques et/ou fonctionnels particuliers. Par exemple, Regan *et al.*, (2011) ont quantifié les gènes impliqués dans la dénitrification (*nirK*, *nirS*, *nosZ*) au sein d'une prairie permanente et sous condition atmosphérique élevée en CO<sub>2</sub>. Ils ont démontré que les fortes émissions de N<sub>2</sub>O sous condition atmosphérique élevée en CO<sub>2</sub> étaient corrélées avec un faible ratio des gènes *nosZ* et *nirK*, suggérant que l'augmentation des émissions de N<sub>2</sub>O peut être causée par une plus forte proportion de N<sub>2</sub>O produits que par le N<sub>2</sub>O consommé par les organismes dénitrifiants (producteurs de N<sub>2</sub>).

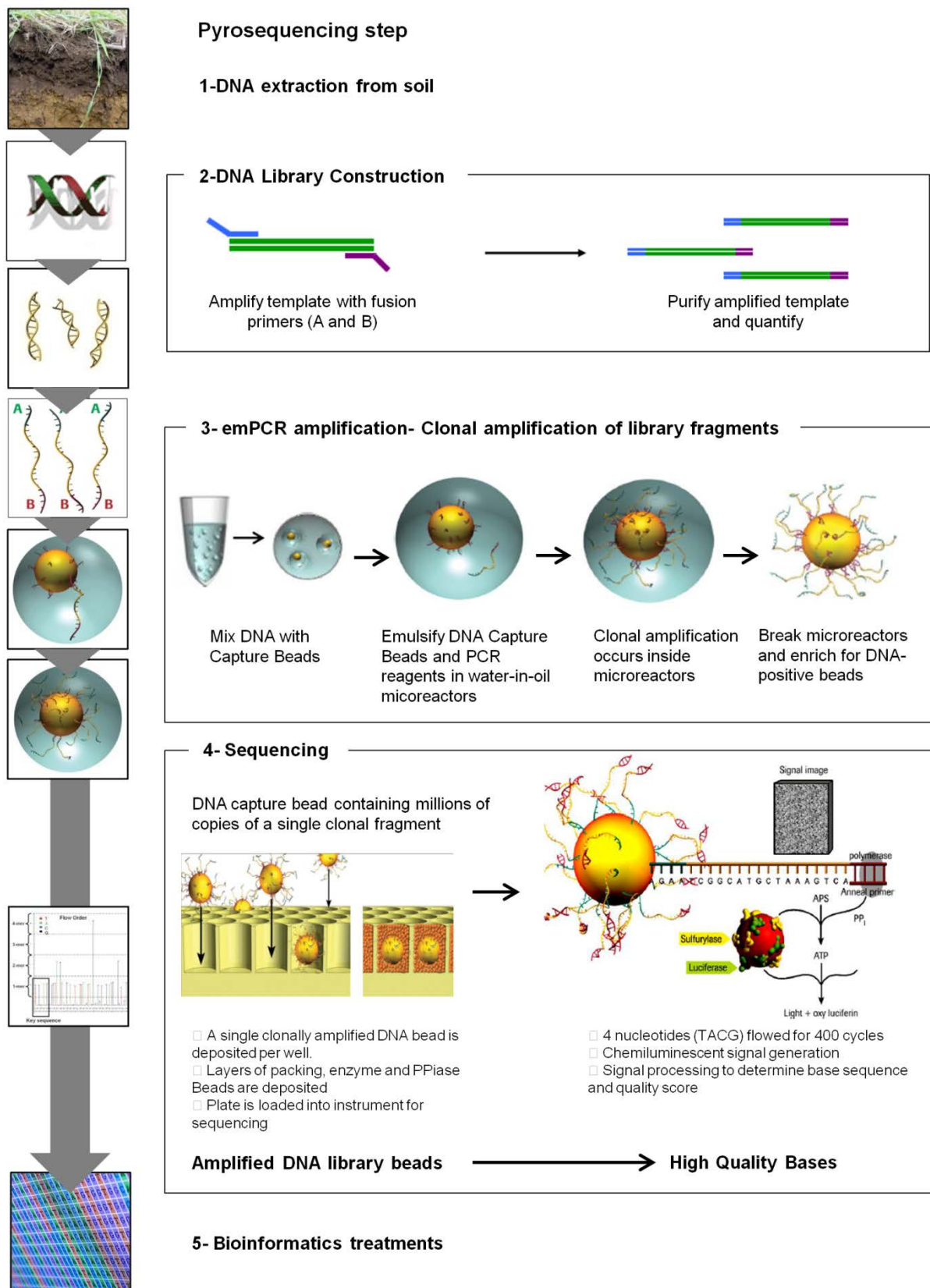
### 2.3.2- Caractérisation de la diversité des communautés microbiennes du sol

La diversité des communautés microbiennes telluriques peut être caractérisée par différentes approches moléculaires permettant l'analyse de la structure (*i.e.* l'assemblage de différentes populations au sein de la communauté) ou de la composition taxonomique des communautés microbiennes (*i.e.* composition de la communauté en termes de nombre et d'abondance relative des différentes populations présentes).

#### ❖ Analyse de la structure génétique des communautés microbiennes

La structure génétique des communautés microbiennes est classiquement déterminée par des techniques de génotypages dites « d'empreinte génétique ». Ces techniques sont basées sur le principe de migration électrophorétique de fragments d'ADN extraits du sol (préalablement amplifiés par PCR) sur gels d'agarose ou de polyacrylamide suivant leurs polymorphismes de tailles (ARDRA, t-RFLP, RISA, RAPD) ou de séquences (DGGE, TGGE). Chacune d'entre elles comporte des avantages et des inconvénients (pour plus d'informations voir *review*: Ranjard *et al.*, 2000; Nocker *et al.*, 2007) mais dans l'ensemble, elles sont rapides, reproductibles, peu coûteuses, et permettent d'analyser en parallèle plusieurs échantillons (Lynch *et al.*, 2004).

En fonction de la nature du gène ciblé, ces approches permettent d'analyser et de comparer la structure génétique à l'échelle de la communauté microbienne totale (Øvreås & Torsvik, 1998) ou de groupes phylogénétiques ou fonctionnels particuliers (Heuer *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2007). L'approche par empreinte génétique a été également fortement utilisée pour évaluer l'impact de perturbations sur la stabilité des communautés microbiennes au sein du sol, comme les pollutions métalliques (Ranjard *et al.*, 1997, 2006, 2008; Bressan *et*



**Figure I-5:** Schéma présentant les différentes étapes de la technique du pyroséquençage (selon Roche®) dans le cadre de l'analyse d'un échantillon de sol. (Source : <http://454.com/products/technology.asp>).

*al.*, 2008), les pollutions chimiques (Girvan *et al.*, 2004; Crouzet *et al.*, 2010) ou encore les événements climatiques (Banning & Murphy, 2008). Ces études ont montré la sensibilité et la spécificité de ces approches pour mettre en évidence des modifications ponctuelles ou chroniques des communautés microbiennes suite à des modifications des conditions environnementales. Cependant, ces techniques de génotypages ne permettent pas d'identifier les taxons ou groupes de taxons microbiens présents (espèces, genres, phylums) et souffrent d'un manque de résolution (Ranjard *et al.*, 2000).

❖ Analyse de la diversité microbienne tellurique

Une analyse plus fine de la diversité des espèces composant les communautés microbiennes du sol est possible grâce aux méthodes de séquençage. Les premières techniques utilisées, appelées clonage/séquençage, consistent à amplifier des séquences d'ADN cibles pour les intégrer ensuite dans des clones à l'aide de vecteurs. Les inserts sont alors séquencés et comparés à des séquences connues et répertoriées dans des bases de données internationales (NCBI, RDP). Ces techniques offrent une haute résolution phylogénétique permettant l'identification des espèces présentes au sein de la communauté (Nocker *et al.*, 2007). Toutefois, l'approche par clonage/séquençage est coûteuse en temps et en argent. Par conséquent, elle se limite généralement au séquençage d'un faible nombre de clones (environ 100 clones par échantillon) sur un faible nombre d'échantillons et ne permet donc pas d'estimer réellement la diversité microbienne.

Le récent développement des technologies de séquençage haut débit (pyroséquençage, SOLiD, illumina) permet de dépasser cette limitation. Par exemple, la technique de pyroséquençage (Figure I-5) permet d'obtenir plusieurs centaines de milliers de séquences d'ADN, à partir d'un seul échantillon extrait du sol. Actuellement, elle représente la méthode la plus puissante pour quantifier précisément et caractériser la diversité microbienne dans des environnements complexes (Roesch *et al.*, 2007; Fulthorpe *et al.*, 2008). L'arrivée de ces nouvelles technologies de plus en plus performantes (et de moins en moins chères !) accompagnée du développement d'outils bioinformatiques puissants d'analyse des séquences génomiques correspond à une grande révolution dans la caractérisation des communautés microbiennes telluriques.

Les approches de métagénomique permettent ainsi d'analyser, dans un très grand nombre de situations environnementales, l'ensemble des séquences d'ADN extraites des communautés indigènes en ciblant soit un gène fournissant des informations taxonomiques



(i.e. gènes ribosomiques; Terrat *et al.*, 2012) ou fonctionnelles (i.e. gènes de fonctions; Philippot *et al.*, 2013). Récemment, plusieurs travaux ont utilisé cette approche pour caractériser la diversité microbienne dans des sols très différents en termes de distance géographique (Roesch *et al.*, 2007; Fulthorpe *et al.*, 2008), de mode d'occupation (forêt, prairie, culture) (Nacke *et al.*, 2011; Shange *et al.*, 2012), ou encore de propriétés physico-chimiques (Lauber *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2010). Ces travaux mettent en évidence que les caractéristiques physicochimiques, aussi bien que le mode d'utilisation des terres et leur histoire sont des drivers importants de la diversité des communautés microbiennes du sol. D'autres auteurs ont utilisé la technique de pyroséquençage pour étudier la distribution de la diversité au sein de certains groupes taxonomiques bactériens. Par exemple, Jones et collaborateurs (2009) ont échantillonné et caractérisé des sols du nord jusqu'au sud de l'Amérique (de l'Alaska à la Patagonie) pour déterminer l'influence des paramètres abiotiques du sol sur l'abondance des *Acidobacteria*. L'utilisation de cette approche leur a permis de définir des attributs écologiques propres à ce groupe de bactéries et de hiérarchiser les paramètres environnementaux expliquant sa distribution spatiale.

### 2.2.3- Outils de caractérisation de l'activité des communautés microbiennes

A ce jour, il existe de nombreuses méthodes qui permettent d'évaluer un processus biologique dans son intégralité, ou une étape spécifique d'un processus. Parmi celles-ci, l'analyse des activités enzymatiques d'un sol est une mesure fonctionnelle intéressante, puisque les enzymes produites par les microorganismes sont impliquées dans les étapes clés des cycles biogéochimiques (C, N, P, S), (Caldwell, 2005). Très utilisée dans les études concernant la décomposition de la matière organique, cette approche est cependant compliquée à interpréter car les enzymes restent actives quand elles sont stabilisées sur la matière organique ou la surface minérale du sol (Nannipieri *et al.*, 2003; Bütemann *et al.*, 2006) et leur synthèse est très variable dans le temps.

L'évaluation des capacités métaboliques et cataboliques apporte aussi une mesure fonctionnelle des communautés microbiennes du sol. Cette mesure peut être effectuée par des techniques utilisant les aptitudes des communautés microbiennes à utiliser certains substrats organiques comme la technologie BIOLOG ou la méthode SIR (Substrate-Induced Respiration). Ces techniques permettent de caractériser et de classer les communautés microbiennes suivant leurs profils métaboliques, et d'avoir une vision rapide de la diversité fonctionnelle d'un sol. Toutefois, la technique BIOLOG comporte de nombreux biais pouvant





gêner l'interprétation de la réelle capacité fonctionnelle d'un sol (Bending *et al.*, 2004; Girvan *et al.*, 2005; Plassart *et al.*, 2008). En effet, elles requièrent une étape d'incubation qui sélectionne les microorganismes cultivables et favorise les microorganismes à croissance rapide. De plus, ces techniques sont sensibles à la densité de l'inoculum (Garland & Mills, 1991). La méthode SIR s'affranchit de ces problèmes et semble être plus précise, mais elle est beaucoup moins utilisée (Nannipieri *et al.*, 2003).

Dans la majorité des études réalisées jusqu'à présent pour évaluer l'implication des communautés microbiennes dans le fonctionnement biologique du sol, les activités microbiennes sont déterminées par des mesures de flux gazeux (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>) (Nannipieri *et al.*, 2003; Blagodatskaya & Kuzyakov, 2013). Dans le cadre des recherches sur le cycle du carbone, les scientifiques mesurent souvent la respiration en présence de substrats organiques spécifiques. Certains auteurs effectuent également des marquages isotopiques sur les composés organiques (carbone 13 ou 14) afin de dissocier la respiration basale du sol et la respiration provenant de la dégradation du composé organique apporté au sol (Gaillard *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 2003; Coppins *et al.*, 2006; Pascault *et al.*, 2013).



### **3- Interactions matière organique/communautés microbiennes dans le sol**

Les développements méthodologiques présentés dans la section précédente permettent de disposer des outils nécessaires à la compréhension des mécanismes microbiens impliqués dans la régulation des processus à la base des services rendus par le sol. Dans cette partie, nous ferons un point sur les travaux réalisés afin de mieux comprendre les interactions entre deux composantes majeures du sol que sont les communautés microbiennes et la matière organique. Dans un premier temps, nous nous focaliserons sur les études visant à identifier les populations, groupes microbiens impliqués dans la réponse des communautés à l'apport de matière organique au sol. Dans un second temps, nous ferons le point sur les travaux réalisés pour déterminer dans quelle mesure ces modifications de diversité/composition peuvent moduler les transformations des matières organiques dans le sol. En termes d'intrants organiques, nous nous concentrerons sur l'apport de résidus végétaux.

#### **3.1- Réponse des communautés microbiennes à l'apport de résidus végétaux**

Au niveau de la composante microbienne, l'apport de MOF dans un sol entraîne généralement une augmentation de la biomasse microbienne, principalement au cours de la première phase de décomposition (Patra *et al.*, 1992; Azmal *et al.*, 1997; Lundquist *et al.*, 1999; Pascault *et al.*, 2013). L'augmentation de biomasse au début de la décomposition s'accompagne également d'une forte activité enzymatique (Bending *et al.*, 2002) et de changements précoces et importants de la structure et de la composition des communautés microbiennes (Aneja *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2007). De nombreuses études se sont intéressées à la dynamique des communautés microbiennes au cours de la dégradation d'un résidu à des échelles de temps allant de quelques semaines à plusieurs mois (McMahon *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2007; Bastian *et al.*, 2009; Baumann *et al.*, 2009; Marschner *et al.*, 2011; Pascault *et al.*, 2010, 2013). Dans la majorité de ces travaux, les auteurs ont observé des modifications de la structure et de la composition des communautés microbiennes pendant la décomposition des résidus. Ces différentes successions microbiennes s'expliquent principalement par les modifications chimiques du résidu au cours de sa décomposition, et par le fait que les espèces microbiennes diffèrent dans leurs capacités métaboliques (Fierer *et al.*, 2007).

Dans la littérature, il est généralement admis que les bactéries dominent la première phase de décomposition, car elles peuvent se développer très rapidement sur les composés facilement disponibles présents dans les résidus fraîchement ajoutés (Paterson *et al.*, 2008;

**Encadré 2: Stratégies adaptatives chez les êtres vivants** (Gobat *et al.*, 2010)

❖ Les *stratégies r* manifestent de fortes aptitudes à coloniser des milieux nouveaux, instables et éphémères, grâce à un taux de reproduction élevé, un développement rapide et une bonne capacité de dispersion. La sélection qui s'opère dans ce cas favorise les taxons à fécondité élevée (ex. certains collemboles, mouches de cadavres, plantes colonisatrices de terrains vagues).

❖ Les *stratégies K* ont des niches écologiques plus spécialisées qu'ils maintiennent grâce à leurs aptitudes compétitives. La survie de ces espèces repose sur la spécialisation. Leur fécondité est limitée par la capacité du milieu. La sélection K favorise l'exploitation du milieu (ex. de nombreux vers de terres, des arbres comme le hêtre et le chêne dans les régions tempérées).

Poll *et al.*, 2008). A l'inverse, les champignons qui ont une croissance plus lente que les bactéries et une plus forte capacité enzymatique, dominent la seconde phase de dégradation durant laquelle la fraction la plus récalcitrante est décomposée (Romaní *et al.*, 2006; Poll *et al.*, 2008; van der Wal *et al.*, 2013). De même, un résidu avec un rapport C/N faible (*e.g.* 15 pour la luzerne) stimulerait davantage les bactéries et inversement un résidu avec un fort C/N (*e.g.* 75 pour le blé) stimulerait davantage les champignons (Rousk & Bååth, 2007). Cependant cette vue de la contribution relative des microorganismes n'est pas catégorique et de nombreuses interactions entre bactéries et champignons ont été mises en évidence pour optimiser la décomposition de certains composés (de Boer *et al.*, 2005). Par exemple, certains auteurs ont montré que la décomposition d'un résidu réalisée seulement par les bactéries était faible, et suggèrent que les produits de décomposition libérés par les champignons est une ressource importante pour les bactéries (Romaní *et al.*, 2006; Meidute *et al.*, 2008).

### **3.2- Caractéristiques écologiques de la composante microbienne impliquée dans la dégradation de la matière organique**

Etant donné que des successions de populations microbiennes sont observées dans plusieurs travaux, certains auteurs ont attribué aux différents groupes microbiens dominants les différentes phases de la succession des caractéristiques écologiques type stratégies-r et stratégies-K (Bernard *et al.*, 2007; Poll *et al.*, 2008; Bastian *et al.*, 2009; Pascault *et al.*, 2010, 2013). Le concept de ces deux types de stratégies a été initialement proposé par MacArthur et Wilson (1967) et se base sur les comportements démographiques des différents taxons de plantes et d'animaux dans le milieu qu'ils exploitent (Encadré 2). En microbiologie, on peut aussi apparenter ces deux types de stratégie aux termes de copiotrophes (stratégies-r) et d'oligotrophes (stratégies-K), qui sont plus souvent utilisés.

Dans le cadre de la dynamique de la matière organique du sol, les microorganismes stratégies-r consommeraient préférentiellement les pools de carbone organique labile, auraient des besoins nutritionnels forts et des taux de croissance rapides quand les ressources sont abondantes (Fierer *et al.*, 2007). De ce fait, les microorganismes stratégies-r seraient plutôt impliqués dans la dégradation de la matière organique fraîche. A l'inverse, les microorganismes stratégies-K présenteraient des taux de croissance plus faibles, mais seraient plus compétitifs que les stratégies-r en condition de faible disponibilité en nutriments, ceci en raison de leur meilleure capacité à exploiter le milieu. Par conséquent, ils seraient plutôt impliqués dans la dégradation de la matière organique native du sol (Fierer *et al.*, 2007). Pour

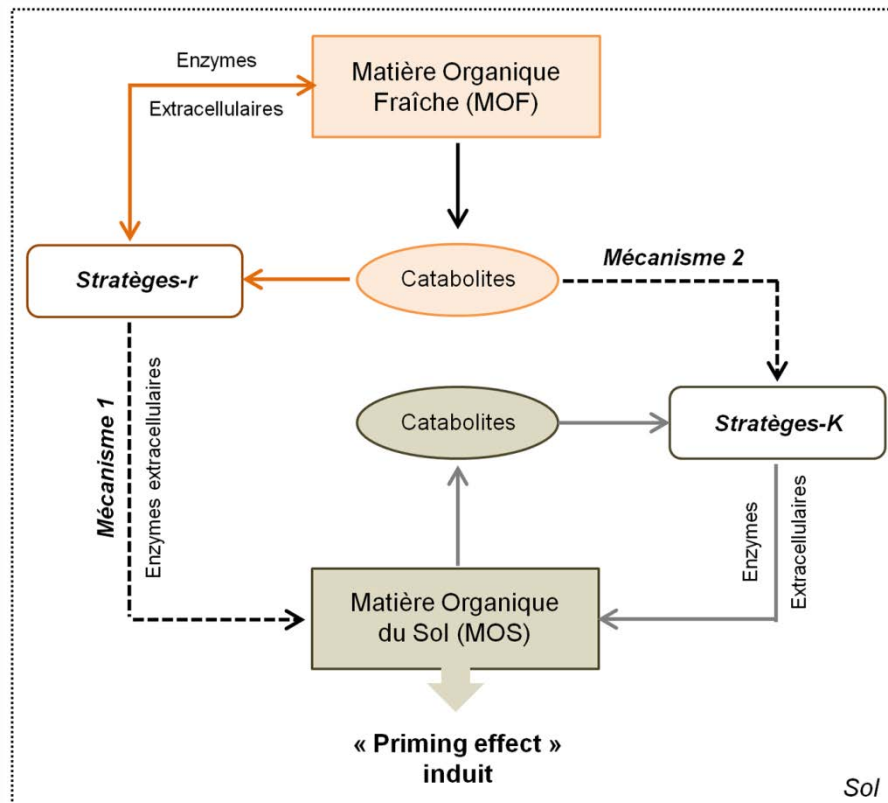


ces raisons, les organismes stratégies-r apparaissent préférentiellement dans le stade précoce de la décomposition de la MOF, contrairement aux stratégies-K intervenant plutôt au stade tardif (Liebich *et al.*, 2006; Poll *et al.*, 2008). Par rapport à l'idée selon laquelle les bactéries dominent la première phase de décomposition et les champignons dominent la deuxième (section 3.1), certains auteurs ont ainsi considéré les bactéries comme des organismes stratégies-r et les champignons des organismes stratégies-K (Poll *et al.*, 2008). Cependant, l'attribution de ces caractéristiques écologiques à ces deux groupes de microorganismes n'est pas aussi simple.

Avec le récent développement des techniques utilisant des isotopes stables (SIP pour Stable Isotope Probing) couplée à des techniques de biologie moléculaire (PLFA-SIP, DNA-SIP, RNA-SIP), plusieurs travaux ont été menés pour identifier spécifiquement les populations microbiennes activement impliquées dans la dégradation de substrats carbonés marqués isotopiquement (par exemple  $^{13}\text{C}$  et/ou  $^{15}\text{N}$ ) (McMahon *et al.*, 2005; Bernard *et al.*, 2007; Neufeld *et al.*, 2007; Chen & Murrell, 2010). En consommant ces substrats marqués isotopiquement, les molécules des cellules microbiennes (ADN, ARN, phospholipides) se retrouvent significativement marquées au  $^{13}\text{C}$  et/ou  $^{15}\text{N}$  et peuvent être ainsi séparées des molécules non marquées ( $^{12}\text{C}$  et/ou  $^{14}\text{N}$ ) correspondant aux populations qui n'ont pas utilisé le substrat. Avec cette approche, plusieurs auteurs ont ainsi montré que certains champignons pouvaient contribuer significativement à la décomposition d'exsudats racinaires, des substrats organiques simples et labiles (De Deyn *et al.*, 2011; Hannula *et al.*, 2012), et donc pouvaient intervenir dans le stade précoce de la décomposition. Dans d'autres études suivant la dynamique des communautés microbiennes après l'incorporation d'un résidu de plante, certains auteurs ont observé au sein de la communauté bactérienne des populations intervenant aux différents stades de la décomposition (Bernard *et al.*, 2007; Pascault *et al.*, 2013). Par exemple, les bactéries appartenant au groupe des *Actinobacteria* sont généralement observées au stade tardif de la décomposition et donc décrites comme des organismes stratégies-K. A l'inverse, les espèces appartenant au groupe des *Proteobacteria* sont souvent observées au stade précoce de la décomposition et sont donc considérées comme des organismes stratégies-r (Bernard *et al.*, 2007; Pascault *et al.*, 2013).

L'intérêt d'attribuer des caractéristiques écologiques (stratégies -r/-K ou oligotrophes/copiotrophes) aux différentes populations microbiennes du sol est de permettre aux scientifiques de mieux représenter cette composante dans les modèles de dynamique des MOS. Par exemple, cette classification a permis à plusieurs auteurs d'essayer de mieux





**Figure I-6:** Schéma conceptuel de l'implication des populations microbiennes selon leur attributs écologiques (stratégies-r/-K) dans les mécanismes du « Priming effect ». Le **mécanisme 1** propose que les enzymes extracellulaires produites par les organismes stratégies-r pour dégrader la MOF puissent aussi être efficace pour dégrader la MOS. Le **mécanisme 2** suggère qu'une proportion des catabolites issus de la dégradation de la MOF par les organismes stratégies-r peut être captée par les organismes stratégies-K. On a alors une augmentation des populations des organismes stratégies-K accompagnée d'une augmentation des enzymes décomposant la MOS et donc un taux de décomposition de la MOS plus élevée. (Modifié d'après Fontaine *et al.*, 2003).

comprendre les mécanismes du « Priming Effect » (PE), processus important dans la dynamique de la MOS.

### *3.2.1- Implication de la composante microbienne dans le « Priming Effect »*

Le « Priming effect » est un processus qui décrit l'accélération de la minéralisation des MOS après un apport de matière organique fraîche (MOF) (Bingeman *et al.*, 1953; Fontaine *et al.*, 2004). Certains auteurs ont montré que l'amplitude de cette sur-minéralisation pouvait être dépendante du type de résidu apporté (Sall *et al.*, 2007) alors que d'autres auteurs ont observé que les PE initiés par différents substrats sont accompagnés par des changements dans la composition des communautés microbiennes (Bell *et al.*, 2003; Falchini *et al.*, 2003; Landi *et al.*, 2006; Blagodatskaya *et al.*, 2007). Par exemple, les travaux de Bell *et al.*, (2003) suggèrent que l'intensité du « Priming effect » serait dépendant de la contribution relative des champignons et des bactéries impliqués dans la décomposition du résidu apporté. Toutefois, malgré la mise en évidence de l'influence de l'apport de MOF sur la dégradation de la matière organique native du sol, les mécanismes qui régissent ce processus sont très controversés (Kuznyakov *et al.*, 2000; Fontaine *et al.*, 2003).

De récents travaux modélisant le PE suggèrent que l'abondance des communautés microbiennes, ainsi que les interactions entre les différents groupes fonctionnels microbiens pourraient contrôler l'intensité du PE (Fontaine & Barot 2005; Neill & Gignoux, 2006). Plus précisément, le PE pourrait résulter d'une compétition entre deux types de microorganismes aux caractéristiques écologiques précédemment évoquées: les microorganismes stratèges-r ou copiotrophes et les microorganismes stratèges-K ou oligotrophes, correspondant respectivement à des populations dégradant préférentiellement la MOF et la MOS (Fontaine *et al.*, 2003). Les premiers travaux expérimentaux examinant cet aspect ont mis en évidence des modifications spécifiques de la structure génétique des communautés bactériennes associées à cette sur-minéralisation de la MO native du sol (Bernard *et al.*, 2007; Pascault *et al.*, 2013). Les populations bactériennes identifiées dans ce processus étaient affiliées taxonomiquement aux *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia* et *Planctomycetes*, populations généralement décrites dans la littérature comme des stratèges-K.

Dans ces travaux, les auteurs ont expliqué cette sur-minéralisation par le fait que les communautés bactériennes considérées comme des stratèges-K aient profité de l'activité des enzymes extracellulaires, produites par les stratèges-r, pour dégrader la MO native du sol (Figure I-6, mécanisme 1). Cependant, l'étude de Pascault *et al.*, (2013) montre que pour des



résidus plus récalcitrants, les mécanismes en jeu pour expliquer le PE sont différents. Par exemple, certaines populations bactériennes activement impliquées dans la dégradation d'un résidu de blé étaient affiliées à des stratégies-K. Cette observation suggère que le deuxième mécanisme proposé par Fontaine *et al.*, (2003) puisse être impliqué dans les processus observés (Figure I-6, mécanisme 2). Ces premiers travaux montrent que la composante microbienne d'un sol est également un paramètre important dans la dynamique de la MOS.

En conclusion, l'analyse récente de la bibliographie nous a montré des avancées majeures sur la caractérisation des communautés microbiennes impliquées dans la dégradation des MOS. L'observation de successions populationnelles, l'identification de groupes microbiens à différents stades de la décomposition et les différentes interactions observées suggèrent une implication forte de la composante biotique dans le turnover de la MOS.

### **3.3- Rôle de la diversité microbienne dans le fonctionnement biologique des sols.**

Dans la section précédente, nous avons analysé les travaux menés sur l'impact de différents résidus de végétaux sur les communautés microbiennes d'un sol. Dans cette partie, nous nous intéresserons aux études ayant pour objectif de déterminer le rôle fonctionnel de la diversité microbienne d'un sol (composition, richesse, evenness, etc.) pour les transformations de la matière organique dans le sol. La compréhension de cette relation entre diversité et fonction est d'autant plus importante que de nombreux travaux actuels ont montré de fortes diminutions/modifications de la diversité microbienne des sols induits par les activités anthropiques. Par exemple, Gans *et al.*, (2005) observe une diminution de 99% de la richesse des génomes bactériens dans les sols pollués par les métaux. De la même façon, plusieurs études conduites dans les agro-écosystèmes ont montré une modification de la diversité microbienne avec l'augmentation de l'intensité de gestion de l'utilisation des terres (Acosta-Martínez *et al.*, 2008; Lienhard *et al.*, 2013; Navarro-Noya *et al.*, 2013). D'autres facteurs liés aux changements climatiques comme l'augmentation de la température et la concentration en CO<sub>2</sub>, la modification du régime hydrique sont aussi associés à des changements importants de la diversité et de la composition des communautés microbiennes (Freeman *et al.*, 2004; Williams 2007b; Bérard *et al.*, 2011; Guenet *et al.*, 2012).

Les quelques travaux examinant l'effet de la diversité microbienne sur le fonctionnement biologique du sol se sont intéressés à différentes fonctions telles que la décomposition de la matière organique (Bell *et al.*, 2005; Baumann *et al.*, 2012), la



nitrification et la dénitrification (Attard *et al.*, 2011; Philippot *et al.*, 2013), la stabilité en réponse à une perturbation (Griffiths *et al.*, 2001a; Wertz *et al.*, 2007), la structure d'un sol (Martin *et al.*, 2012), la gestion des microorganismes pathogènes (Vivant *et al.*, 2013), mais aussi la productivité primaire (Chaparro *et al.*, 2012). Pour « isoler » l'effet de la diversité sur les processus étudiés, une stratégie de « manipulation » de la diversité a été mise en œuvre dans la plupart de ces travaux.

A la suite de cette section, nous présenterons dans un premier temps les principales approches utilisées dans la littérature pour manipuler la diversité microbienne d'un sol. Dans un second temps, nous ferons une synthèse des premiers travaux examinant l'influence du nombre d'espèces sur les activités liées au cycle du carbone, mais aussi sur la stabilité fonctionnelle et/ou populationnelle des communautés microbiennes telluriques.

### **3.4- Manipulation de la diversité microbienne d'un sol**

Les études abordant le lien entre la diversité des communautés microbiennes, leurs stabilités et leurs capacités fonctionnelles ont montré que la simplification est essentielle pour la démonstration du lien entre diversité et fonction. Deux types d'approches expérimentales peuvent être dégagés de la littérature pour manipuler la diversité microbienne : (i) l'approche par construction, et (ii) l'approche par érosion.

#### **❖ Construction de la diversité**

L'approche par construction consiste à créer des consortiums de communautés microbiennes en assemblant des espèces préalablement isolées sur milieu de culture à partir d'un environnement. Plusieurs auteurs ont utilisé cette approche (Naeem & Li, 1997; Wohl *et al.*, 2004; Setälä & McLean, 2004; Bell *et al.*, 2005; Tiunov & Scheu, 2005; Toljander *et al.*, 2006) qui a permis de mettre en évidence de nombreuses relations entre diversité et fonction. Toutefois, l'inconvénient majeur de cette approche est que la diversité sélectionnée n'est pas du tout représentative de la diversité des communautés indigènes du sol. En effet, les communautés reconstituées par ces auteurs peuvent se composer de 5 (Tiunov & Scheu, 2005) à 72 espèces (Bell *et al.*, 2005), alors que la communauté microbienne d'un sol est caractérisée par une grande diversité génétique (section 1.3). De plus, seules les espèces microbiennes ayant la capacité de croître sur milieu de culture sont sélectionnées, ce qui par conséquent entraîne un fort biais sélectif par rapport aux traits écologiques des microorganismes.



❖ Erosion de la diversité, biocide vs. dilution

Afin de contourner les biais méthodologiques inhérents à l'approche par construction, certains auteurs ont privilégié l'approche par érosion. Cette approche consiste à réduire de façon progressive la diversité microbienne originelle d'un sol pour créer un gradient de diversité d'espèces, généralement composé de trois niveaux de diversité (faible, moyenne et forte). Deux techniques d'érosion sont couramment utilisées, comportant chacune des biais liés au traitement appliqué : la technique par fumigation et la technique de dilution-extinction. La technique de fumigation consiste à appliquer sur le sol un stress non rémanent (du chloroforme) visant à réduire la diversité microbienne en tuant une partie des populations sensibles (Degens, 1998; Griffiths *et al.*, 2000, 2001a, 2004, Garcia-Pausas & Paterson, 2011). En fonction de la durée de la perturbation, différents niveaux de diversité sont ainsi créés. Toutefois cette technique est sélective car les microorganismes présentant une bonne capacité adaptative et des caractéristiques physiologiques particulières ne sont pas éliminés.

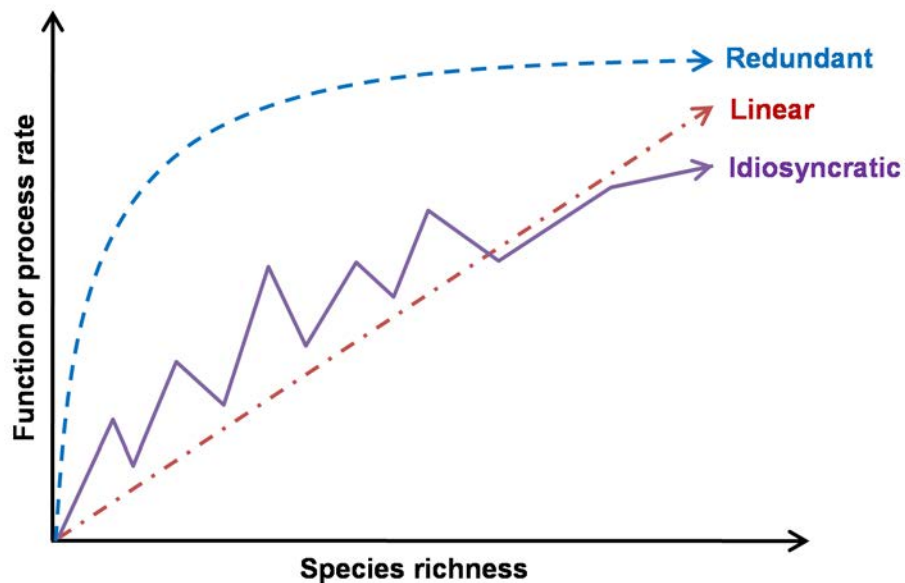
La technique de dilution-extinction a été initiée par Salenius en 1981 et reprise plus récemment dans plusieurs travaux (Franklin *et al.*, 2001; Wertz *et al.*, 2006; Baumann *et al.*, 2012; Philippot *et al.*, 2013; Vivant *et al.*, 2013). Cette technique consiste à inoculer des microcosmes de sol stérile avec des niveaux croissants de dilutions de suspensions de sol. Cette méthode est moins destructive que la fumigation et permet de simplifier la diversité microbienne. Cependant, le désavantage est que ce sont les microorganismes les plus abondants dans la communauté qui sont sélectionnés (Garland & Lehman, 1999; Dimitriu *et al.*, 2010).

D'autres auteurs ont également utilisé une approche moins artificielle et qui consiste à comparer des sols exhibant naturellement des niveaux de diversité microbienne contrastés (Girvan *et al.*, 2005). Toutefois, le biais de cette approche est que les sols comparés ont souvent des propriétés physiques et chimiques très différentes, et que l'effet de ces propriétés peut se confondre avec l'effet du nombre d'espèces microbiennes.

### **3.5- Relation entre la diversité microbienne et le cycle du carbone**

A ce jour, plusieurs travaux ont examiné la relation entre la diversité microbienne et le cycle du carbone en utilisant les différentes approches présentées ci-dessus (Nielsen *et al.*, 2011). Dans la majorité de ces études, les processus considérés sont (i) la décomposition d'un substrat (perte de masse d'un résidu apporté) ou (ii) la respiration induite ou non par l'apport





**Figure I-7:** Représentation des trois formes généralement admises lorsqu’une relation positive est observée entre la richesse en espèces et le fonctionnement des écosystèmes. La relation **linéaire** se produirait si chaque espèce possède des caractéristiques uniques qui améliorent le processus ou la fonction en question. La forme **redondante** ou asymptotique se produirait si les espèces partagent des caractéristiques communes qui améliorent le fonctionnement du système. Ainsi, la probabilité d’ajouter une espèce ayant des caractéristiques qui ne sont pas présentes dans la communauté devient progressivement petite lorsque le nombre d’espèce augmente. La relation **idiosyncratique** se produirait si des espèces présentant des caractéristiques similaires diffèrent dans leur capacité à améliorer la fonction, ou si les interactions biotiques augmentent (e.g. la facilitation) ou diminuent (e.g. la compétition) le fonctionnement du sol. Dans ce dernier cas, la composition des communautés est plus importante que la richesse en espèces (Adapté de Nielsen *et al.*, 2011)

d'un substrat (flux de CO<sub>2</sub> provenant du sol). L'analyse de la littérature existante montre que la relation entre le nombre d'espèces microbiennes (richesse) et les processus associés au cycle du carbone peut être positive à négative, ou neutre lorsque qu'aucune relation n'est observée.

### *3.5.1- Relations neutres*

Dans le cadre des études examinant la relation entre le nombre d'espèces microbiennes et les activités liées au cycle du carbone, plusieurs auteurs n'ont observé aucune relation (Griffiths *et al.*, 2000, 2001, 2004; Wertz *et al.*, 2006). Dans ces travaux, les auteurs ont manipulé la diversité microbienne par des approches d'érosion (dilution et/ou fumigation) afin de prendre en compte l'ensemble de la diversité d'un sol. Une des raisons proposées par ces auteurs pour expliquer l'absence de relation se base sur la redondance fonctionnelle des activités microbiennes liées au cycle du carbone (Nannipieri *et al.*, 2003).

### *3.5.2- Relations positives*

Plusieurs auteurs ont observé des relations positives entre le nombre d'espèces et les activités liées au cycle du carbone (Salonius 1981b; Setälä & McLean, 2004; Wohl *et al.*, 2004; Tiunov & Scheu, 2005; Bell *et al.*, 2005; Liebich *et al.*, 2007; Baumann *et al.*, 2012). Les relations positives observées dans ces études peuvent prendre plusieurs formes, associées à des mécanismes sous-jacents spécifiques. Trois types de relation sont couramment retrouvées dans les recherches entre la diversité et le fonctionnement des écosystèmes : la forme linéaire, la forme asymptotique (ou redondante) et la forme idiosyncratique (Nielsen *et al.*, 2011; Figure I-7).

-La forme linéaire suggère que l'addition d'une nouvelle espèce quelconque aura une influence positive sur les processus de décomposition. Cette forme a seulement été observée par Tiunov et Scheu, (2005) qui ont montré une augmentation de la respiration corrélée à l'augmentation du nombre d'espèces fongiques inoculées sur un substrat de cellulose. Cependant, seul un maximum de 5 espèces a été utilisé dans cette étude, rendant difficile l'extrapolation de cette relation à l'ensemble des communautés microbiennes du sol.

-La forme redondante (ou asymptotique) a été observée par plusieurs auteurs (Setälä & McLean 2004; Bell *et al.*, 2005) et suggère que l'addition d'une nouvelle espèce aura une influence positive sur les processus jusqu'à un certain seuil de richesse. Une fois le seuil



atteint, l'addition de nouvelles espèces n'aura plus aucun effet sur les activités, et la communauté microbienne sera redondante d'un point de vue fonctionnel pour l'activité mesurée.

-Enfin, la relation idiosyncratique est supposée se produire lorsque une espèce a une plus grande influence qu'une autre espèce au sein de la communauté. Plusieurs auteurs ont observé cette forme et suggèrent que la composition (c'est-à-dire la présence/absence d'espèces particulières dans la communauté) est plus importante dans le fonctionnement du cycle du carbone que le nombre d'espèces présentes dans la communauté (Wohl *et al.*, 2004; Liebig *et al.*, 2007).

Les principaux mécanismes proposés par les auteurs pour expliquer le lien entre la diversité microbienne et les différentes activités mesurées sont la complémentarité des niches et les interactions biotiques telles que la facilitation écologique et le mutualisme (Bell *et al.*, 2005; Baumann *et al.*, 2012). Le mécanisme de complémentarité des niches est basé sur le constat que chaque espèce se développe au sein d'une niche écologique qui lui est propre et qui est définie en fonction des exigences de cette espèce aux niveaux physico-chimiques, trophiques et biologiques (Loreau & Hector, 2001). Différentes espèces occupent donc différents habitats et utilisent différentes ressources. En conséquence, l'augmentation de la diversité microbienne entraîne une meilleure performance des activités liées aux cycles du carbone, à travers une meilleure occupation de l'espace et donc une meilleure exploitation des ressources par la communauté et à l'élargissement de la gamme de substrats utilisés. Pour les interactions biotiques telles que la facilitation, les produits de décomposition d'une espèce peuvent agir en tant que ressource pour une autre espèce, augmentant ainsi la disponibilité de niches (Bell *et al.*, 2005).

Dans la majorité des travaux observant une relation positive, la diversité manipulée se limite généralement à un faible nombre d'espèces (une centaine au maximum), et l'approche par construction est souvent la plus utilisée. Par conséquent, il est difficile d'extrapoler ce type de relation aux communautés microbiennes d'un sol qui peut représenter plusieurs milliers d'espèces (Torsvik & Øvreås, 2002). De plus, les relations positives observées sont souvent dépendantes, au moins en partie, de la composition plutôt que de la richesse et la plupart des formes de relations sont soit redondantes, soit idiosyncratiques. Ces observations suggèrent que pour des communautés microbiennes plus riches en espèces, les activités liées aux cycles du carbone seraient redondantes d'un point de vue fonctionnel. Toutefois, les récents travaux de Baumann *et al.*, (2012) montrent que la décomposition d'un résidu de blé

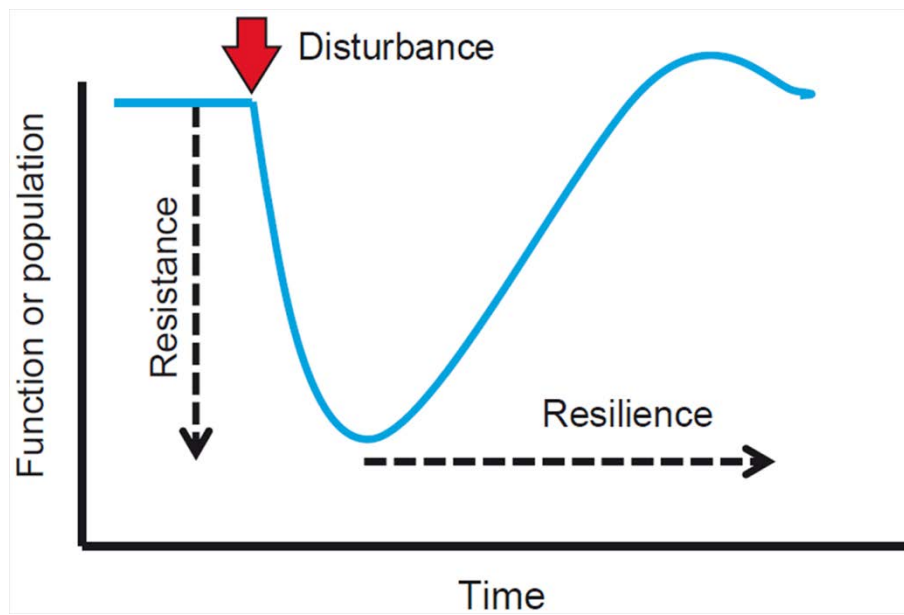


incorporé au sol est beaucoup moins importante à un niveau faible de diversité. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé l'approche par dilution-inoculation pour créer un gradient de diversité. Les consortiums microbiens qui se sont développés dans les microcosmes de sols contenaient plusieurs centaines d'espèces pour le traitement le moins diversifié. Les résultats obtenus ont clairement démontré une corrélation entre la richesse microbienne du sol et la dégradation de certains composés biochimiques du blé, tels que les sucres (arabinose, xylose) ou la lignine (Baumann *et al.*, 2012).

### *3.5.3- Relations négatives*

Un certain nombre de relations négatives ont été observées par quelques auteurs entre le nombre d'espèces et les activités liées au cycle du carbone (Griffiths *et al.*, 2000, 2001a; Toljander *et al.*, 2006). Par exemple, quand différentes combinaisons de carbone, azote et/ou phosphore sont ajoutées au sol, l'intensité de respiration du sol a été significativement plus importante pour les sols les moins diversifiés (Griffiths *et al.*, 2001a). De même, Toljander *et al.*, (2006) observent sur une période de 6 mois et à température constante, une plus faible décomposition du bois lorsque celui-ci a été inoculé avec les communautés de champignons les plus diverses. Toutefois dans cette étude, les espèces de champignons inoculées en début d'expérimentation pour les communautés les plus diverses ne sont pas toutes retrouvées à la fin de l'incubation. Les relations négatives observées peuvent se produire lorsque les interactions de compétitions entre les espèces au sein de la communauté sont plus fortes que les effets de complémentarité de niche. L'augmentation du nombre d'espèces est susceptible d'accroître la concurrence inter-spécifique, et dans certains cas, cela peut l'emporter sur les effets positifs de la complémentarité et/ou la présence d'espèces très influentes sur les processus liés au cycle du carbone.

En conclusion, les résultats contradictoires du peu d'études disponibles dans la littérature ne permettent pas d'établir un consensus clair quant à l'effet de la diversité sur les processus biologiques associés au cycle du carbone. Les différentes relations observées sont très dépendantes des approches utilisées pour manipuler la diversité microbienne d'un sol. Il est donc nécessaire de poursuivre d'autres investigations pour mieux comprendre le rôle de la diversité microbienne du sol dans le cycle du carbone.



**Figure I-8:** Représentation schématique des composantes de la stabilité (fonctionnelle ou populationnelle): résistance et résilience après une perturbation (Griffiths & Philippot, 2013).

### **3.6- Relation entre la diversité microbienne, la stabilité fonctionnelle et structurale des communautés microbiennes.**

Jusqu'ici nous avons examiné la relation entre la diversité microbienne du sol et les activités liées au cycle du carbone en termes d'amplitude et de vitesse des processus biologiques. Cependant, il y a un autre aspect en lien avec le fonctionnement biologique du sol que la richesse en espèce peut influencer : la stabilité. En écologie, la notion de stabilité détermine la capacité d'un système à continuer à fonctionner sous des conditions changeantes, qui peuvent se produire à travers des processus naturels ou des perturbations liées aux activités humaines (Orwin & Wardle, 2004). La stabilité est donc un paramètre important dans le fonctionnement biologique du sol (Seybold *et al.*, 1999) et fait directement référence au concept « d'assurance écologique » proposé par Yachi et Loreau en 1999. Ce concept prédit que dans un environnement fluctuant, la présence d'un grand nombre d'espèces garantit le maintien du fonctionnement d'un écosystème. Cette propriété est basée sur l'idée que les fonctions écosystémiques (e.g. recyclage des nutriments, fixation du carbone, etc.) sont chacune assurées par un groupe fonctionnel, c'est-à-dire un pool d'espèces ayant la même fonction dans le système. La taille de chaque pool (*i.e.* le nombre d'espèces) détermine le niveau de redondance fonctionnelle du groupe. Ainsi, dans des milieux non perturbés, la présence d'un nombre minimum de groupes fonctionnels est essentielle au fonctionnement de l'écosystème, mais la diversité au sein de chaque groupe joue relativement peu puisque les espèces sont redondantes d'un point de vue fonctionnel. En revanche, dans des milieux perturbés la présence d'une grande diversité d'espèces augmente la probabilité qu'au moins certaines d'entre elles puissent survivre, voire prospérer quelles que soient les conditions, et donc garantir le maintien du fonctionnement du système. C'est pourquoi le niveau de diversité peut être considéré comme une assurance pour la stabilité de l'écosystème, particulièrement importante dans le cas des agro-écosystèmes qui sont régulièrement soumis à des perturbations liées aux pratiques agricoles.

#### *3.6.1- Composantes et mesures de la stabilité des communautés microbiennes*

Généralement, en écologie, la stabilité se divise en deux composantes: la résistance et la résilience (Figure I-8). La résistance se définit par la capacité d'un système à éviter un déplacement lorsque celui-ci est perturbé. La résilience se définit quant à elle par la vitesse à laquelle un système retourne à son état initial après avoir subi une perturbation (Seybold *et al.*, 1999). Dans les travaux examinant la stabilité des communautés microbiennes, le type de



**Tableau I-2:** Différentes méthodes pour le calcul des indices de résistance et de résilience

Resistance	Résilience	Références
$\frac{P_0}{C_0}$	$\frac{P_x}{P_0}$	Kaufman (1982)
$\frac{P_0}{C_0} \times 100$	$\frac{P_x}{P_0}$	Sousa (1980), Kuan et al., (2007)
$\left(C_0 - \frac{P_0}{C_0}\right) \times 100$	$\left(C_x - \frac{P_x}{C_x}\right) \times 100$	Griffiths et al., (2000, 2001)
$1 - \left(\frac{2 C_0 - P_0 }{C_0 +  C_0 - P_0 }\right)$	$\left(\frac{2 C_0 - P_0 }{ C_0 - P_0  +  C_x - P_x }\right) - 1$	Orwin & Wardle (2004)

$C$ , correspond à la variable mesurée dans les échantillons de sols contrôles (non perturbé) au temps 0 (immédiatement après l'application de la perturbation) ou au temps  $x$  après la perturbation.  $P$ , représente la variable mesurée dans les échantillons de sols perturbés au temps 0 (immédiatement après l'application de la perturbation) ou au temps  $x$  après la perturbation.

perturbation appliquée varie d'une étude à l'autre, et peut être représenté par une pollution métallique (Griffiths *et al.*, 2001a; Tobor-kaplon *et al.*, 2005; Bressan *et al.*, 2008), une pollution chimique (pesticides, hydrocarbures) (Girvan *et al.*, 2005; Crouzet *et al.*, 2010), ou des événements climatiques comme un stress thermique, la simulation d'une pluie, un cycle de sécheresse-humectation (Steenwerth *et al.*, 2005; Banning & Murphy, 2008; Chaer *et al.*, 2009), etc. Parmi l'ensemble des perturbations utilisées on peut distinguer deux types de stress : les stress transitoires et les stress rémanents. Les perturbations transitoires, comme un stress thermique, peuvent être retirées après l'application à court terme, tandis que les perturbations rémanentes, telles que les pollutions aux métaux lourds, ne peuvent être enlevées du sol, exerçant ainsi un stress à long terme sur le sol. Dans les études examinant le lien entre la diversité microbienne et la stabilité, la résistance et la résilience sont mesurées sur des paramètres fonctionnels (*i.e.* les activités métaboliques, la décomposition d'un substrat, la dénitrification, la nitrification, etc.) et/ou sur des paramètres biologiques microbiens (*i.e.* biomasse, structure génétique, etc.).

Deux approches sont possibles pour mesurer la stabilité fonctionnelle et/ou structurale des communautés microbiennes. La première approche consiste à comparer un échantillon de sol avant et après l'application d'une perturbation (Griffiths & Philippot, 2013). Toutefois, cette approche est peu utilisée car elle ne prend pas en compte les changements qui peuvent se produire dans l'échantillon de sol avant et après l'application d'une perturbation (e.g. les changements saisonniers dans le cadre d'une expérimentation sur le terrain). La deuxième approche employée dans la majorité des travaux consiste à utiliser un échantillon control (non perturbé) et un échantillon perturbé en même temps, afin d'éliminer cette incertitude (Orwin & Wardle, 2004). Dans la littérature, il existe différents indices permettant de calculer la résistance et la résilience (Deng (2012); Table I-2). Ces indices correspondent généralement à une proportion ou un pourcentage de la variable mesurée dans l'échantillon perturbé comparé à l'échantillon control au même temps d'incubation.

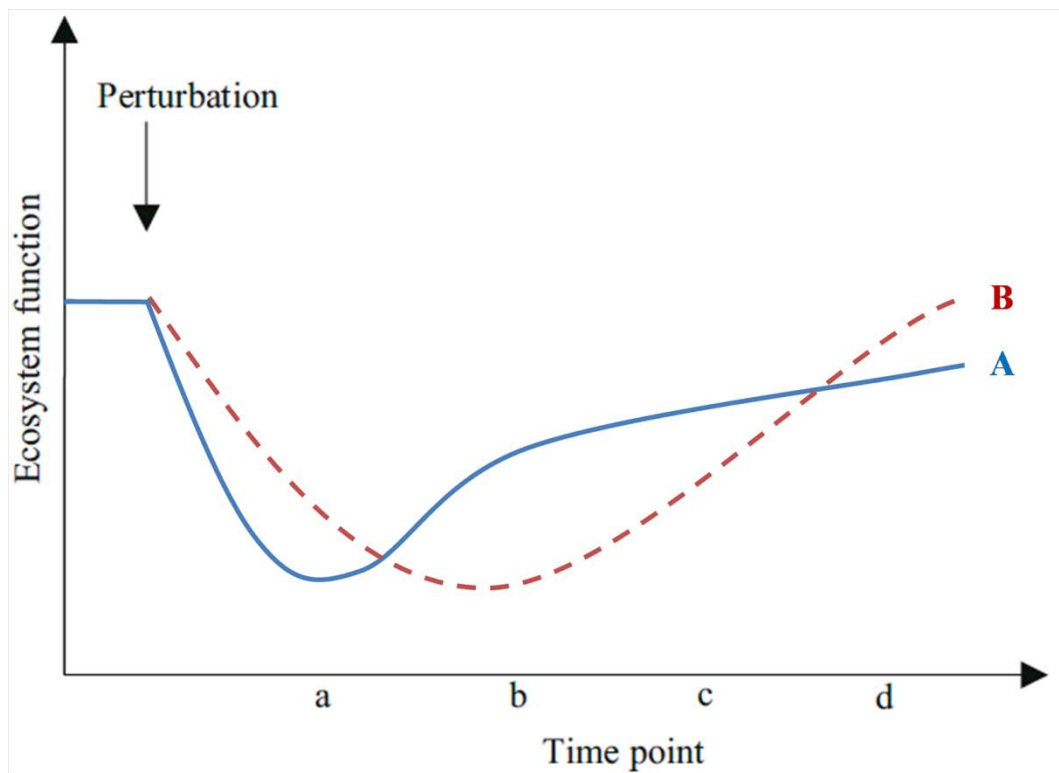
### *3.6.2- Relations entre diversité microbienne et stabilité*

Dans la littérature très peu d'études ont testé l'influence du nombre d'espèces microbiennes sur la stabilité fonctionnelle et/ou structurale des communautés, et les relations observées varient d'une étude à l'autre. Certains travaux ne suggèrent aucun effet (Degens 1998; Griffiths *et al.*, 2001a; Wertz *et al.*, 2006, 2007), alors que d'autres montrent qu'après une perturbation, la résistance et la résilience des communautés microbiennes et des



paramètres fonctionnels étudiés augmentent avec le nombre d'espèces (Griffiths *et al.*, 2000, 2001b; Degens *et al.*, 2001; Girvan *et al.*, 2005; Tobor-kaplon *et al.*, 2005). Comme pour les activités liées au cycle du carbone (section 3.6), les relations observées par ces auteurs sont souvent dépendantes des approches utilisées pour manipuler la diversité (Deng, 2012), mais aussi du type de perturbation appliquée et de la fonction regardée (Griffiths *et al.*, 2001). Par conséquent, le manque de cohérence entre les travaux et les résultats contradictoires observés laissent supposer que les fonctions biologiques du sol sont partagées par un très grand pool d'espèces (Loreau, 2004). En plus d'une forte redondance fonctionnelle suspectée, les microorganismes exhibent un haut degré de plasticité métabolique et de tolérance physiologique aux changements de conditions environnementales (Allison & Martiny, 2008). Par exemple, les mécanismes de transfert de gènes de résistance permettent à des organismes sensibles de s'adapter très rapidement à une perturbation (Rensing *et al.*, 2002; Springael & Top, 2004) et peuvent ainsi contribuer à la stabilité des paramètres fonctionnels dans un sol perturbé.

D'autres travaux suggèrent que la stabilité fonctionnelle et structurale des communautés microbiennes sont régies par d'autres paramètres biologiques que le nombre d'espèces présentes dans la communauté. Par exemple, Griffiths *et al.*, (2004) montrent que la résilience de la décomposition de la matière organique du sol est reliée plus spécifiquement à des espèces présentes au sein de la communauté microbienne (relation idiosyncratique). Dans une étude plus récente, Wittebolle *et al.*, (2009) manipulent la richesse et l'évenness (i.e. l'abondance relative des espèces présentes dans la communauté) de la communauté bactérienne dénitrifiante du sol. Ils démontrent que la stabilité de la dénitrification en réponse à un stress salin est plus importante lorsque l'évenness des communautés est grande (c'est-à-dire lorsque l'abondance relative des espèces est répartie de façon homogène dans la communauté). En conséquence, une communauté dominée par une ou plusieurs espèces microbiennes serait beaucoup moins stable d'un point de vue populationnelle ou fonctionnelle, et ce indépendamment du nombre total d'espèces présentes au sein de la communauté. L'ensemble de ces observations montre que la relation D-S au niveau du sol est complexe, et qu'elle peut dépendre de plusieurs paramètres biotiques (richesse, evenness, composition).



**Figure I-9:** Dynamique fonctionnelle ou populationnelle entre la communauté **A** et **B** après une perturbation. Ce schéma montre l'importance la variation temporelle dans les mesures de stabilité des communautés microbiennes. Si la résistance est déterminée au temps « a/b », alors la communauté A sera plus/moins résistante que la communauté B. Si la résilience est mesurée au temps « c/d », alors la communauté A sera plus/moins résiliente que la communauté B (Adapté de Deng, 2012).

### 3.6.3- Facteurs influençant la relation diversité-stabilité

Le manque de cohérence des résultats entre les travaux examinant la relation D-S au niveau du sol peut s'expliquer par de nombreux autres facteurs qui peuvent interagir dans la réponse (résistance et résilience) des communautés microbiennes. Ces facteurs peuvent être liés (i) aux temps d'échantillonnage (ii) à la nature de la perturbation appliquée mais aussi (iii) aux propriétés physico-chimiques des sols.

#### ❖ Influence du temps d'échantillonnage

Le temps d'échantillonnage est un élément important dans la mesure de la stabilité et varie énormément d'une étude à l'autre. Par exemple, la résistance d'un paramètre fonctionnel et/ou biologique peut être mesurée après plusieurs heures (Wertz *et al.*, 2007), 1 jour (Tobor-kaplon *et al.*, 2005), 3 jours (Chaer *et al.*, 2009) ou plus, après l'application d'une perturbation. A l'inverse la résilience est généralement mesurée à la fin de la période d'incubation et diffère selon les travaux (Griffiths *et al.*, 2001; Girvan *et al.*, 2005; Banning & Murphy, 2008). Les différents temps d'échantillonnage entre les études peuvent en partie expliquer les différences de relations observées par les auteurs. Par exemple, la figure I-9 montre que si la résistance est déterminée au temps 'b' et la résilience au temps 'c', alors la communauté A sera plus résiliente et résistante que la communauté B. Cependant, si la résistance est déterminée au temps 'a' et la résilience au temps 'd', les résultats seront contradictoires. De plus, le sol est un environnement fluctuant à l'intérieur duquel les espèces microbiennes ont un temps de génération très court (*i.e.* jusqu'à 20 minutes pour certaines espèces bactériennes). Il est donc important de maximiser le nombre d'échantillonnage après l'application d'une perturbation afin de couvrir au maximum la réponse des communautés microbiennes.

#### ❖ Influence de l'intensité et de la nature de la perturbation appliquée

Dans les travaux, une grande variété de perturbations a été utilisée par les auteurs, incluant les métaux lourds (Cu, Zn, Hg, Pb, *etc.*), les événements climatiques, les pesticides, les hydrocarbures, *etc.* Le choix du type de perturbation (rémanente ou transitoire) et de son intensité peut entraîner différents effets sur la réponse des communautés microbiennes et sur la relation D-S. Récemment, Deng (2012) a proposé 4 scénarios possibles pour l'application d'une perturbation rémanente sur la relation D-S des communautés microbiennes. Dans le scénario 1, la perturbation est faible et cause un stress mineur sur les communautés



microbiennes riches ou pauvres en espèces. En conséquence, aucune corrélation entre diversité et stabilité ne peut être mise en évidence. Dans le scénario **2**, la perturbation est forte et certaines espèces sont inhibées ou éliminées. Cependant, il reste toujours des espèces résistantes dans la communauté (riche et pauvre en espèces) et la relation D-S sera dépendante de la capacité des espèces résistantes à remplacer les espèces sensibles d'un point de vue fonctionnel. Le scénario **3** suppose que la perturbation est plus forte que le scénario 2, et que certaines espèces dans la communauté la plus diverse et toutes les espèces microbiennes dans la communauté la moins diverse sont inhibées ou éliminées. Dans ce scénario les espèces redondantes dans la communauté la plus diversifiée contribueront à la résistance et la résilience, et dans ce cas une relation D-S positive est attendue. Enfin, dans le scénario **4**, la perturbation est assez forte pour inhiber ou éliminer toutes les espèces, que ce soit dans la communauté riche ou pauvre en espèces, par conséquent il n'y aura pas de corrélation entre la diversité et la stabilité. En plus des différences d'intensité, l'impact d'une perturbation transitoire sera différent de celui d'une perturbation rémanente dans les scénarios 2, 3 et 4 présentés ci-dessus, puisque les espèces inhibées pourront récupérer après l'application du stress transitoire et contribuer à la résilience. Ce cas de figure s'est retrouvé dans de nombreux travaux où après l'application d'un stress thermique, le sol présentait une plus forte résilience (au niveau de la structure et du fonctionnement des communautés microbiennes) que lorsqu'une pollution au cuivre était appliquée (Griffiths *et al.*, 2001a; Kuan *et al.*, 2006; Gregory *et al.*, 2009).

❖ Influence des paramètres physico-chimiques des sols

Les propriétés physico-chimiques du sol telles que le pH, la quantité de matière organique, la texture peuvent fortement influencer la réponse des communautés microbiennes à une perturbation. Par exemple la biodisponibilité de certains polluants comme le cuivre ou le mercure est fortement liée à la quantité de matière organique présente dans un sol (Harris-Hellal *et al.*, 2009; Lejon *et al.*, 2010). D'autres paramètres comme le pH, la quantité d'argile ou la teneur en oxyde de fer d'un sol sont reconnus pour modifier la solubilité des métaux lourds (Giller *et al.*, 1998) et par conséquent modifier l'intensité de la perturbation que représente l'apport de ces éléments. Dans la littérature, il est généralement admis qu'un sol avec un fort taux de matière organique et/ou d'argile joue un rôle tampon plus efficace face aux pollutions et offre une meilleure protection pour les microorganismes (Kuan *et al.*, 2006; Gregory *et al.*, 2009). Par conséquent, les propriétés physico-chimiques d'un sol peuvent modifier l'impact d'une perturbation sur la stabilité fonctionnelle et/ou structurale des





communautés microbiennes et entraîner des effets de confusion chez les auteurs quant à l'effet réel du nombre d'espèces. Ces effets confondants ont déjà été observés dans une étude menée par Girvan *et al.*, (2005). Ces auteurs ont comparé la stabilité de deux sols présentant des quantités de matière organique différentes (minéral *vs* organo-minéral) et donc supposés différent en termes de diversité. Ils ont démontré qu'après une pollution au benzène ou au cuivre, le sol organo-minéral présentant la plus forte diversité (mais aussi la plus forte teneur en matière organique) était plus résistant et résilient que le sol minéral supposé moins divers (Girvan *et al.*, 2005). Cependant, ces résultats ne permettent pas d'affirmer si la stabilité des paramètres mesurés est influencée par une plus forte diversité d'espèces ou par une plus grande quantité de matière organique.

Dans la mesure où la diversité (ou la composition) des communautés microbiennes présente dans un sol est fortement dépendante de ces propriétés physico-chimiques, il est très difficile de distinguer l'importance de ces deux facteurs sur la stabilité. Afin de démêler la contribution des facteurs biotiques et abiotiques sur la stabilité d'un sol, Griffiths *et al.*, (2008) ont inoculé 26 sols stériles différents avec un seul microorganisme, *Pseudomonas fluorescens*. Ils ont démontré que la résistance (taux de décomposition d'un substrat) à une pollution métallique ou à un stress thermique variait en fonction du type de sol. De même, la résilience de cet organisme variait selon que celui-ci était inoculé dans un sol sableux ou dans un sol argilo-limoneux (Griffiths *et al.*, 2008). Ces résultats démontrent l'importance des propriétés physico-chimiques du sol dans la réponse des communautés microbiennes à une perturbation en termes de stabilité fonctionnelle et/ou populationnelle.



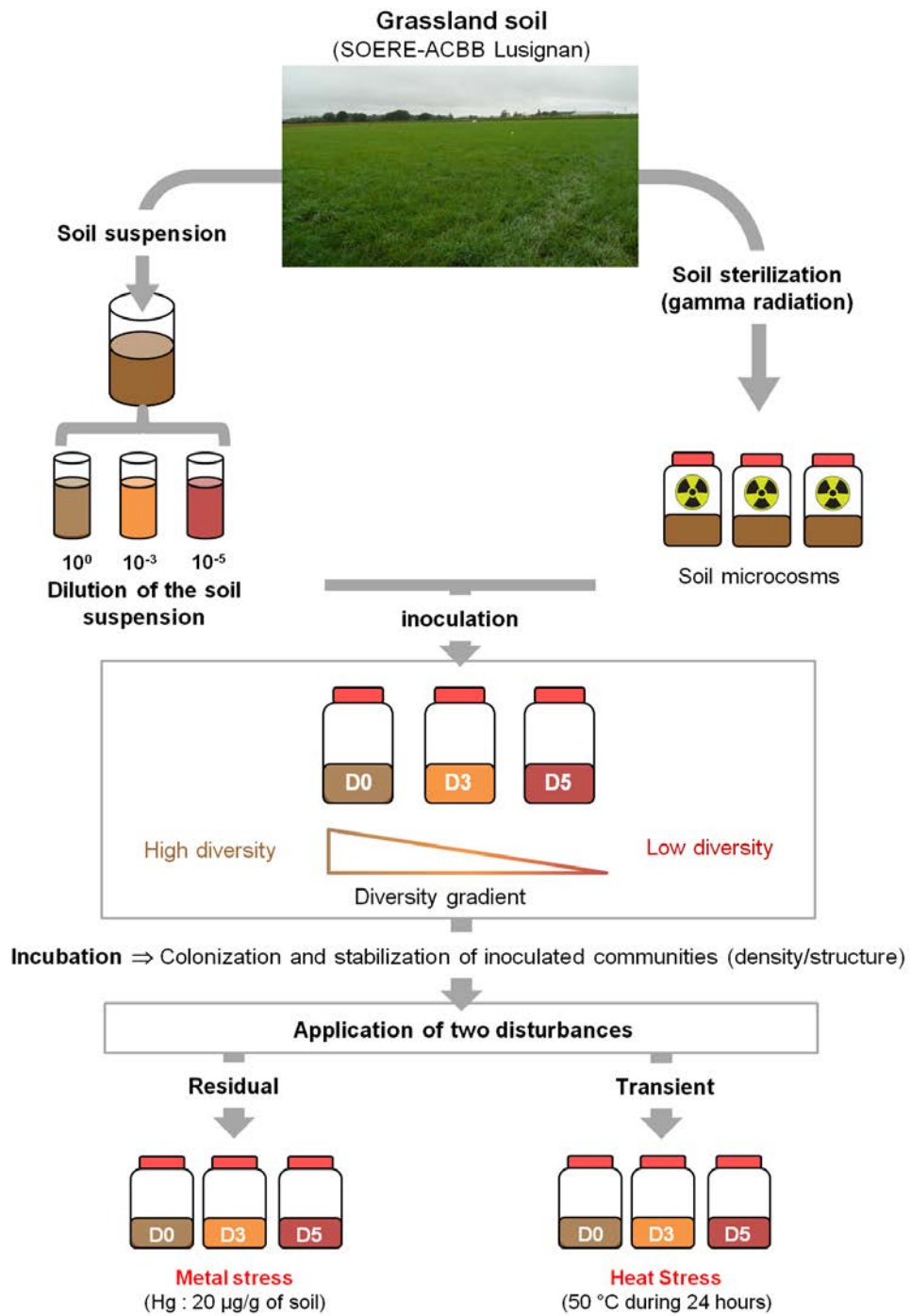
## **4- Conclusion**

Cette synthèse bibliographique présentait un état de l'art sur les recherches impliquant la diversité des communautés microbiennes et le fonctionnement biologique du sol à travers deux sorties fonctionnelles complémentaires : les activités liées au cycle du carbone et la stabilité des communautés (structurale et fonctionnelle). Dans un premiers temps, nous avons vu que les récentes avancées méthodologiques permettent, aujourd'hui, d'avoir accès à un panel de techniques indispensables pour caractériser les communautés microbiennes telluriques de manière quantitative, qualitative et fonctionnelle. Ces progrès méthodologiques ont permis notamment d'améliorer nos connaissances sur la réponse des communautés microbiennes (en termes de biomasse, diversité, composition, etc.) à différents stimuli environnementaux (pollution, modification climatique, apport de matière organique, etc.). Par exemple, nous avons vu dans cette synthèse que de nombreux travaux ont permis de progresser dans la caractérisation des communautés microbiennes impliquées dans la dégradation de la matière organique (successions de populations, attribution de caractéristiques écologiques type stratégies  $r/K$ , etc.). Toutefois, les travaux examinant l'influence de la diversité microbienne sur la réponse des communautés (associée à la dégradation de la MO et à la stabilité fonctionnelle/structurale des communautés) sont beaucoup moins nombreux et les résultats contradictoires ne permettent pas d'établir de consensus. L'analyse de la bibliographie montre que le manque de cohérence entre ces différentes études s'explique en partie par (i) les différentes approches utilisées par les auteurs pour manipuler la diversité microbienne du sol, (ii) la stratégie expérimentale mis en œuvre pour mesurer les différents paramètres étudiés, mais aussi par (iii) les caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés. L'autre point qui ressort de cette analyse et qui nous semble important de tenir compte dans ces travaux de thèse, c'est le manque d'expérimentations réalisées au champ. Dans la majorité des études, la relation diversité microbienne-stabilité-fonction est examinée en condition contrôlée (microcosme de sol). Par conséquent, des travaux supplémentaires sont nécessaires afin d'améliorer notre compréhension sur le rôle fonctionnel des communautés microbiennes impliquées dans la régulation des stocks et des flux de carbone, mais aussi dans la réponse de ces communautés face aux modifications de nos écosystèmes.



# **Chapitre II:**

Influence de la diversité microbienne sur la stabilité  
structurale et fonctionnelle des communautés



**Figure II-1:** Représentation schématique de l'expérimentation – Dilution-inoculation.

Dans le cadre des recherches entre la diversité microbienne et le fonctionnement biologique du sol présentées dans la synthèse bibliographique, nous nous sommes particulièrement intéressés au concept d'« assurance écologique » proposé par Yachi et Loreau (1999) [Chapitre I, section 3.7]. Ce concept prédit que dans un environnement fluctuant, une forte diversité d'espèces entraîne une meilleure stabilité des communautés et par conséquent assure le maintien des fonctions essentielles de l'écosystème. L'analyse de la littérature nous a montré que le nombre de travaux examinant cette relation aux niveaux des communautés microbiennes du sol était faible et que les résultats contradictoires entre les différentes études ne permettaient pas d'établir un consensus sur le lien entre la diversité et la stabilité structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes du sol (Deng, 2012, [chapitre I, section 3.7.2]). Nous avons également vu que le manque de cohérence entre les différents travaux pouvait être lié à des problèmes méthodologiques (temps d'échantillonnage court, choix de la perturbation), mais aussi aux caractéristiques physicochimiques des sols [Chapitre I, section 3.7.3]. De plus, dans les travaux examinant ce lien, différentes approches ont été utilisées pour manipuler la diversité microbienne mais aucune « quantification » précise des différents niveaux de diversité créés n'a été réalisée.

Dans ce contexte, le premier travail expérimental de ma thèse a eu pour objectif de tester l'influence de la diversité microbienne sur la stabilité (résistance/résilience) structurale et fonctionnelle des communautés. Plus précisément, cette étude avait pour objectifs :

- 1- d'étudier l'impact de l'érosion de diversité (baisse du nombre d'espèces au sein de la communauté) sur la stabilité structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes en réponse à deux types de perturbation (rémanente/non rémanente) ;
- 2- d'évaluer le lien entre la réponse des communautés (structure génétique) et l'activité mesurée (respiration du sol).

Pour cela, une érosion de la diversité a été réalisée en conditions contrôlées par inoculation de microcosmes de sol stérile avec différentes dilutions d'une suspension de sol de prairie (ORE, Lusignan) afin de créer trois niveaux de diversité (Figure II-1). Le gradient de diversité microbienne obtenu a été caractérisé par le séquençage massif des gènes ADNr -16S et -18S. Pour chaque niveau de diversité, la réponse des communautés microbiennes à l'application d'un stress rémanent (pollution au mercure) ou non rémanent (choc thermique) a ensuite été caractérisée par le suivi :

- de la structure génétique (bactéries et champignons)





- de la cinétique de dégagement de CO<sub>2</sub> dû à la minéralisation du carbone

Cette étude sera présentée sous la forme d'un article publié dans la revue *Environmental Microbiology reports* : DOI: 10.1111/1758-2229.12126.



# **Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity**

Vincent Tardy<sup>1</sup>, Olivier Mathieu<sup>3</sup>, Jean Leveque<sup>3</sup>, Sébastien Terrat<sup>2</sup>, Abad Chabbi<sup>4</sup>, Philippe Lemanceau<sup>1</sup>, Lionel Ranjard<sup>1,2</sup> & Pierre-Alain Maron<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*INRA, UMR 1347 Agroecology, Dijon, France*

<sup>2</sup>*INRA, Plateforme GenoSol, UMR1347 Agroecology, Dijon, France*

<sup>3</sup>*UMR Université de Bourgogne, Biogéosciences 5561, Dijon, France*

<sup>4</sup>*INRA, Centre de recherche Poitou-Charentes, Lusignan, France*

**Correspondance:** P.A. Maron, INRA, UMR1347 Agroecology, 17 rue Sully, 21000, Dijon, France

Email: [pierre-alain.maron@dijon.inra.fr](mailto:pierre-alain.maron@dijon.inra.fr)

**Running title:** Linking microbial diversity and stability



## **Abstract**

Despite the central role of microbes in soil processes, empirical evidence concerning the effect of their diversity on soil stability remains controversial. Here, we addressed the ecological insurance hypothesis by examining the stability of microbial communities along a gradient of soil microbial diversity in response to mercury pollution and heat stress. Diversity was manipulated by dilution extinction approach. Structural and functional stabilities of microbial communities were assessed from patterns of genetic structure and soil respiration after the stress. Dilution led to the establishment of a consistent diversity gradient, as revealed by 454 sequencing of ribosomal genes. Diversity stability was enhanced in species-rich communities whatever the stress whereas functional stability was improved with increasing diversity after heat stress, but not after mercury pollution. This discrepancy implies that the relevance of ecological insurance for soil microbial communities might depend on the type of stress. Our results also suggest that the significance of microbial diversity for soil functional stability might increase with available soil resources. This could have strong repercussions in the current “global changes” context since it suggests that the combined increased frequencies of extreme climatic events, nutrient loading and biotic exploitation may amplify the functional consequences of diversity decrease.



## 1- Introduction

Human activities and climatic changes are leading to a rapid and significant reduction of biodiversity, referred to as “the sixth extinction” (Vitousek *et al.*, 1997; Barnosky *et al.*, 2011). As a consequence, understanding the effect of diversity on ecosystem functioning and stability is now a central issue in ecological sciences (Chapin *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2012). Most significant progress to date has been achieved through studies targeting above-ground organisms, particularly plants. Such studies revealed a greater productivity and stability of species-rich communities (Balvanera *et al.*, 2006; Cardinale *et al.*, 2012; Campbell *et al.*, 2011; Hooper *et al.*, 2012).

In contrast with plants, the diversity-functioning relationship remains largely unexplored for soil microorganisms (Balvanera *et al.*, 2006; Reed & Martiny, 2007). As a consequence, the significance of microbial diversity for soil ecosystem functioning and stability remains controversial. Some studies have suggested no effect (Griffiths *et al.*, 2001a; Degens, 1998; Wertz *et al.*, 2006, 2007), while others have shown that the resistance and resilience of microbial processes central to carbon cycling, following disturbance, may be increased with increasing microbial diversity (Griffiths *et al.*, 2000, 2001b; Degens *et al.*, 2001; Girvan *et al.*, 2005; Tobor-kaplon *et al.*, 2005). Such controversial conclusions might result from the high functional redundancy of soil microbial communities, *i.e.* most soil processes are carried out by large pools of microbial species (Loreau, 2004). Consequently, biodiversity may buffer the functional shifts induced by environmental variations, hence providing a kind of ecological insurance for ecosystems (Yachi & Loreau, 1999). This hypothesis may be even more significant for microbial communities given their huge diversity. However, to date, it has not been fully validated experimentally. The few studies that have addressed this important question used different approaches to manipulate microbial diversity, but did not provide a true quantification of the resulting diversity erosion (Griffiths *et al.*, 2001a; Wertz *et al.*, 2006, 2007). Nor did they include parallel assessments of the structural and functional responses of microbial communities following disturbance. As a consequence, the extent to which a decrease in microbial diversity might affect the maintenance of both diversity and functioning following disturbance remains an open question. Given the importance of microbial communities for soil ecosystem functioning, studies providing such evidence should be highly relevant to predict how much the current impact of anthropic activities and climate changes on soil microbial diversity is likely to affect soil services.

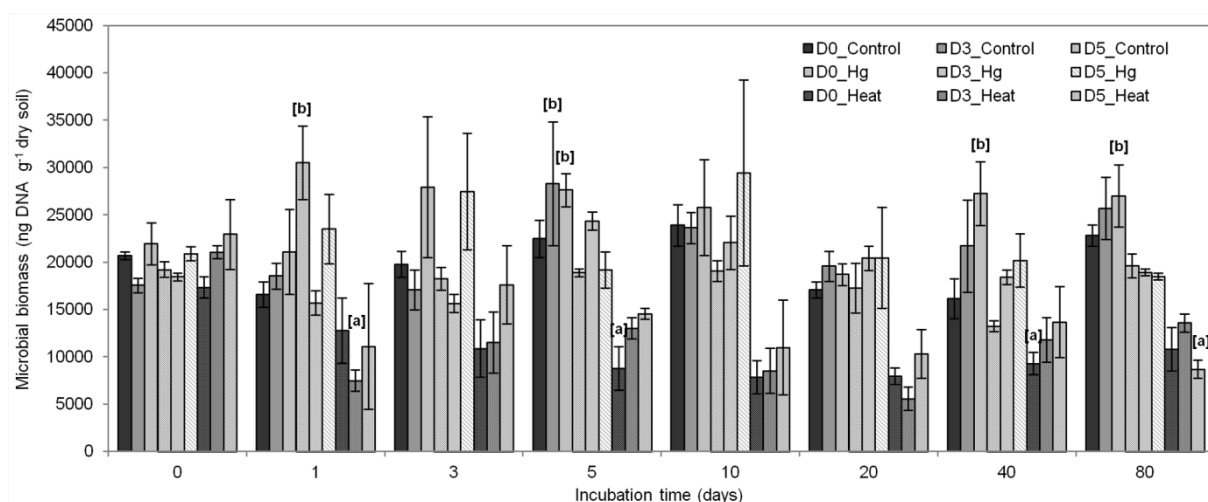




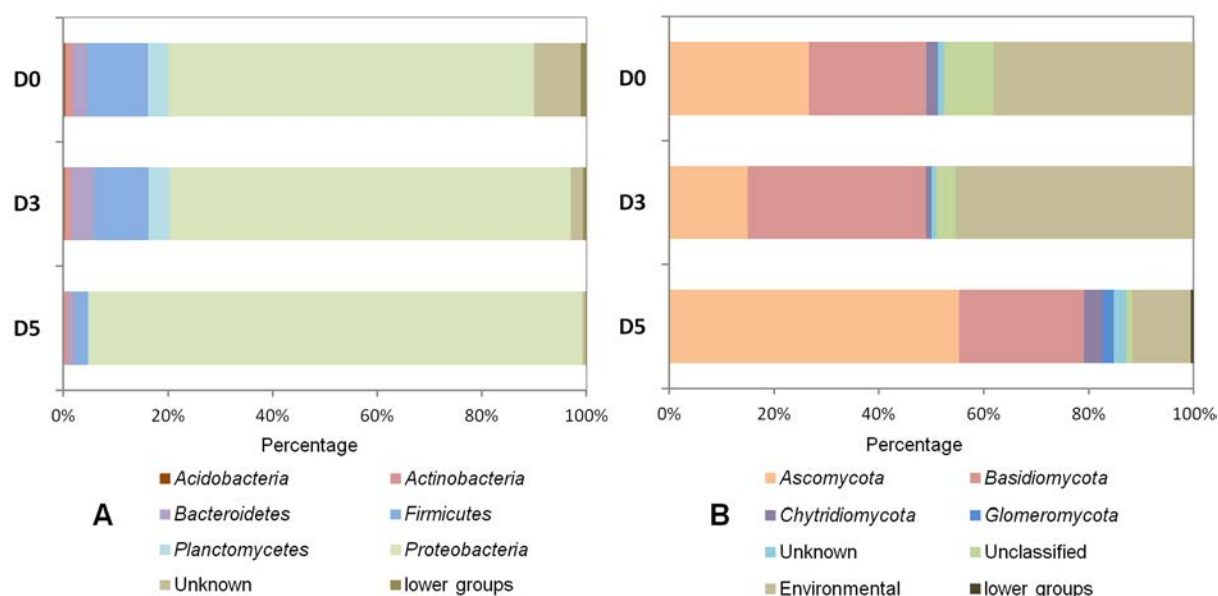
In this study we hypothesized that (i) the structural and functional stability of soil microbial communities would increase with increasing microbial diversity, and (ii) the significance of diversity for community stability would depend on the nature of the applied disturbance. We therefore examined the impact of a decrease in soil microbial diversity on the stability (resistance and resilience) of the genetic structure and activity of microbial communities following two types of disturbance: persistent heavy metal pollution and a transient heat shock. A removal approach, involving the inoculation of sterile soil microcosms with different dilutions of a soil microbial suspension, was used to manipulate microbial diversity (Griffiths *et al.*, 2004; Wertz *et al.*, 2006, 2007, Baumann *et al.*, 2012; Philippot *et al.*, 2013) since it minimized the effects of environmental factors and focused on the microbial diversity. Briefly, soil was collected from the top 10 cm of a Cambisol near Lusignan (France: 46°25'12.91''N; 0°07'29.35''E, SOERE-ACBB, <http://www.soere-acbb.com/fr/>), sieved to < 2mm, divided into microcosms consisting in 20g dry weight soil placed in 150-ml hermetically sealed plasma flasks, and then sterilized by  $\gamma$ -radiation (35 KGy; Conservatome, Dagneux, France). Sterile soil microcosms were inoculated with suspensions of the same soil, but not sterilized, as described previously (Baumann *et al.*, 2012; Philippot *et al.*, 2013). An initial soil suspension was prepared by mixing 100 g soil (equivalent dry mass) with 300 ml sterile distilled water using a Waring blender. After blending for 5 min at maximum speed, the soil suspension was serially diluted. Three levels of dilution of the soil suspension were used as inocula to create a gradient of diversity, that is, undiluted ( $10^0$ ; D1),  $1/10^3$  dilution (D3) and  $1/10^5$  dilution (D5). For inoculation, 5.2 ml of each inocula have been poured on the soil. Since density of the non-sterile soil was  $2.10^8$  cells per g dry soil (determined by UFC (colony-forming unit) counting, data not shown), density of inoculated cells were around  $3.5 \times 10^8$ ,  $3.5 \times 10^5$ , and  $3.5 \times 10^3$  UFC per microcosm for D0, D3 and D5, respectively. After inoculation, the microcosms were pre-incubated for 6 weeks at 20°C to allow colonization and stabilization of the inoculated communities in terms of density and structure. During pre-incubation time, microcosms were aerated every week by flushing with air and soil water content was maintained constant. The microcosms, each containing a different diversity level, were then exposed to (i) heat shock, (ii) mercury pollution, or (iii) left undisturbed (controls). For heat stress, the microcosms were incubated at 50°C for 24 h. Mercury pollution consisted of spiking the soil with a solution of mercury ( $20 \mu\text{g g}^{-1}$  dry soil). After treatment, the microcosms were maintained at 60% of the maximum water holding capacity (WHC) (corresponding to 5.2 ml H<sub>2</sub>O for 10g soil) and incubated at 20°C for eighty days. In total, there were 216 microcosms (3 treatments x 3 levels of diversity x 8 dates of sacrifice x 3



replicates). After 0, 1, 3, 5, 10, 20, 40, 80 days of incubation, triplicate microcosms for each treatment and diversity level were sacrificed for molecular analysis. At T0, the magnitude of microbial diversity loss (bacterial and fungal) was quantified by high-throughput pyrosequencing of ribosomal genes (16S- and 18S-rDNA for bacteria and fungi, respectively). Microbial biomass was followed in each treatment and diversity level through quantification of DNA extracted from soil. Marstorp *et al.*, (2000) and Widmer *et al.*, (2006), indeed demonstrated a high correlation between soil DNA content and microbial biomass estimated by chloroform fumigation, and they concluded that these two methods were equivalent to measuring soil microbial biomass. The response of microbial communities to the applied stress was investigated by monitoring genetic structure by ARISA fingerprinting and soil respiration over time.



**Figure II-2:** Soil microbial biomass (ng DNA g<sup>-1</sup> dry soil) for each treatment and level of diversity, during the incubation. Letters in bracket indicate a significantly different biomass (Kruskal-Wallis test;  $P < 0.05$ ). Error bars denote standard deviation of biological replicates (n=3).



**Figure II-3:** Relative abundances of both (A) bacterial and (B) fungal *phyla* of microbial community composition for each level of diversity at T0. Lower groups represent the phylogenetic groups (*phyla*) with a relative abundance < 1%.

## 2- Results

### 2.1- Microbial density

Similar abundances of bacterial and fungal communities were observed at T0, whatever the diversity level (Table II-1). Thus, the 16S- and 18S-rDNA gene copy numbers per gram of dry soil were on average  $1.4 \times 10^{11}$  and  $1.1 \times 10^9$  gene copies  $g^{-1}$  in all microcosms. Microbial molecular biomass at T0 also showed similar values between the three diversity levels (Figure II-2). After application of the stress, no difference of biomass was observed according to the diversity level whatever the time of incubation or the treatment considered. During the incubation, microbial biomass in the mercury treatment was similar to control, whereas values tended to be lower in the heat treatment.

**Table II-1:** Diversity and density parameters of the microbial communities (bacteria and fungi) for each level of diversity before the application of stress (T0). Values are averages from 3 replicates for the index of diversity and 9 replicates for density  $\pm$  standard deviation. For each level of diversity, values with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Communities	Level of diversity	Sequences after equalization and filtering steps	Index of diversity			Density
			Richness <sup>a</sup>	Shannon <sup>b</sup>	Evenness <sup>c</sup>	Log genes copies $g^{-1}$ of dry soil
Bacterial (16S rDNA)	D0	8885	889 $\pm$ 139.1 (a)	4.49 $\pm$ 0.19 (a)	0.66 $\pm$ 0.01 (a)	$1.20 \times 10^{11} \pm 9.61 \times 10^{10}$ (a)
	D3	7487	606 $\pm$ 44.8 (ab)	4.10 $\pm$ 0.06 (ab)	0.64 $\pm$ 0.02 (ab)	$1.54 \times 10^{11} \pm 5.59 \times 10^{10}$ (a)
	D5	8066	248 $\pm$ 15.3 (b)	1.98 $\pm$ 0.13 (b)	0.36 $\pm$ 0.02 (b)	$1.50 \times 10^{11} \pm 7.17 \times 10^{10}$ (a)
Fungal (18S rDNA)	D0	15573	480 $\pm$ 17.4 (a)	3.25 $\pm$ 0.02 (a)	0.53 $\pm$ 0.00 (a)	$9.11 \times 10^8 \pm 2.38 \times 10^8$ (a)
	D3	16198	327 $\pm$ 50.8 (a)	2.07 $\pm$ 0.69 (a)	0.36 $\pm$ 0.11 (a)	$2.16 \times 10^8 \pm 2.18 \times 10^8$ (a)
	D5	14942	316 $\pm$ 93.5 (a)	2.55 $\pm$ 0.83 (a)	0.44 $\pm$ 0.12 (a)	$1.79 \times 10^8 \pm 1.44 \times 10^8$ (b)

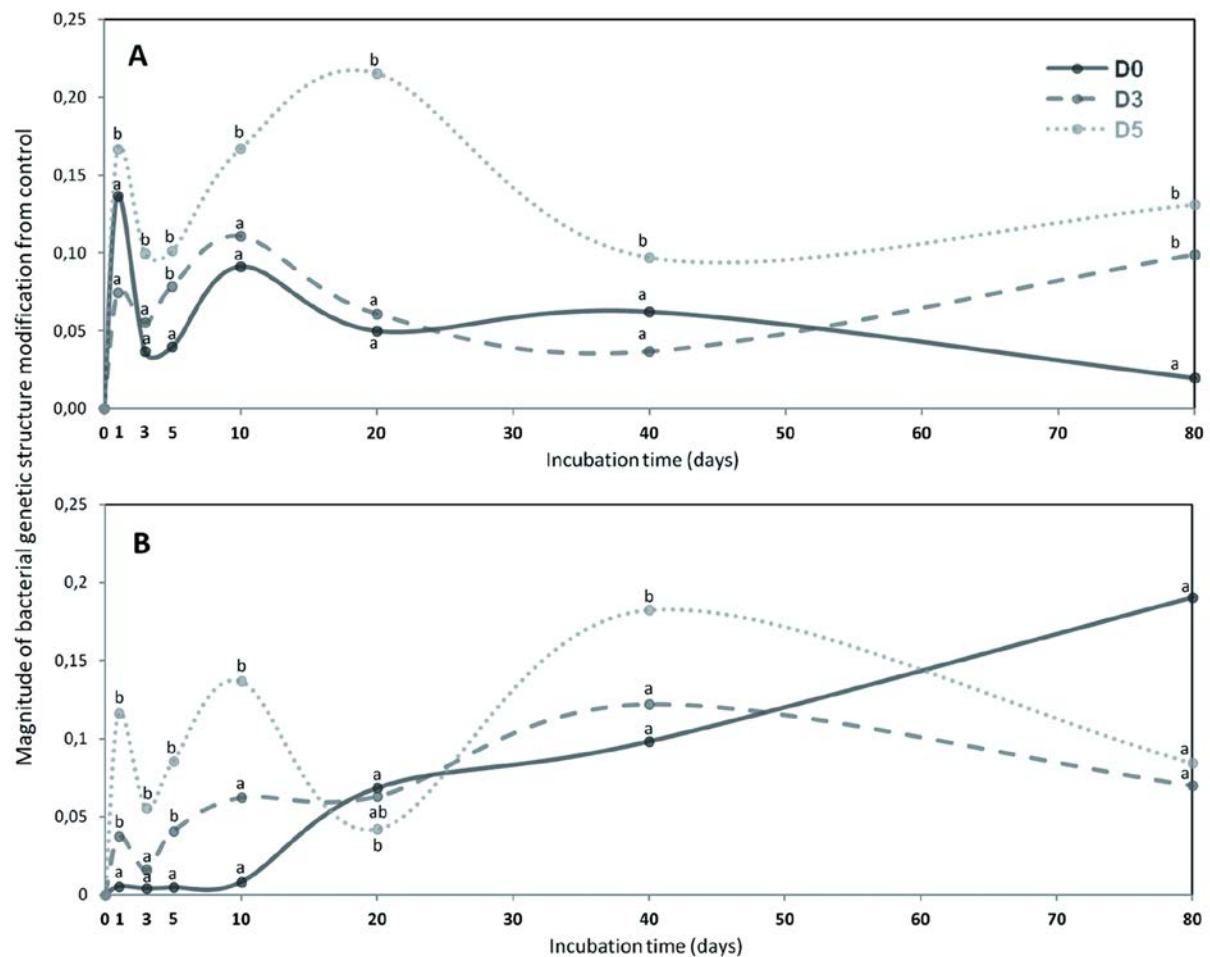
<sup>a</sup> Richness refers to the number of OTU defined at the genus level

<sup>b</sup> Shannon diversity index. A higher number represents more diversity

<sup>c</sup> Evenness is a measure of the relative abundance of the different species making up the richness

### 2.2- Microbial diversity at T0

Totals of 181,448 and 225,339 sequences of 16S- and 18S-rDNA genes, respectively, were generated from the 9 samples by pyrosequencing. For bacterial communities, the average OTU richness ranged from 889 (D0) to 606 (D3) and 248 (D5), evidencing a significant decrease in species OTU richness ( $P < 0.05$ ) with increasing dilution (Table II-1). Shannon and evenness indexes showed the same trend with a considerable decrease for the low diversity treatment D5 (1.98) compared to D0 (4.49) and D3 (4.10). Concerning fungal diversity, average species richness tended to decrease according to the dilution (average OTU number ranged from 480 (D0) to 327 (D3) and 316 (D5)), but differences between the three diversity levels were not significant (Table II-1). In the same way, the Shannon index also



**Figure II-4:** Magnitude of the bacterial genetic structure modifications during 80 days after (A) heat stress and (B) mercury pollution for the three levels of diversity; D0 (black full line), D3 (grey dotted line) and D5 (light grey dashed line). Magnitude was determined by calculating the Euclidean distance between disturbed and control microcosms for each incubation time. Notation indicates a significantly different response in terms of genetic structure change between the three levels of diversity (Kruskal-Wallis test;  $P < 0.05$ ).

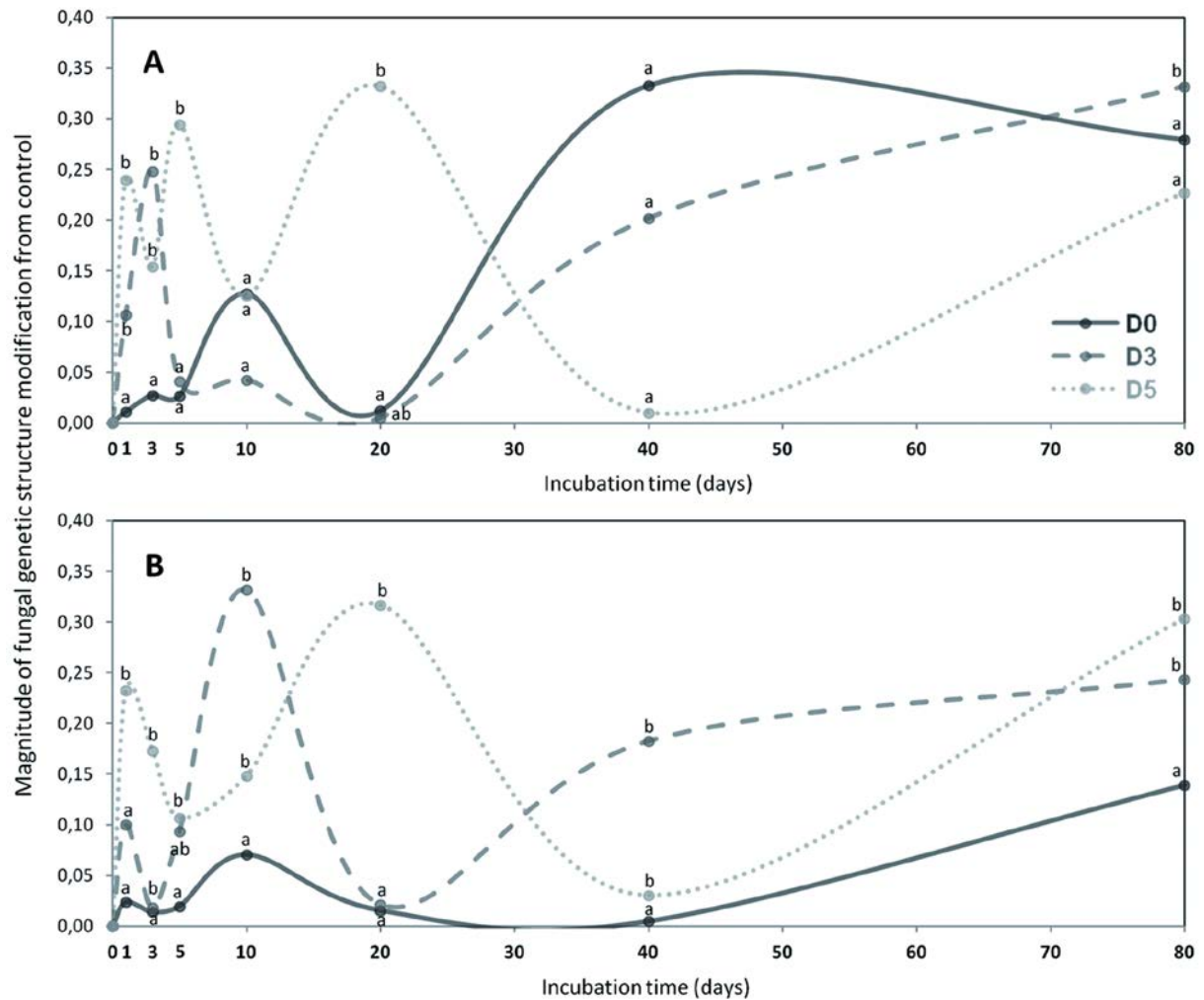
indicated a reduction of diversity in the diluted treatments (D3 and D5) compared to the undiluted soil D0. Index values were in agreement with rarefaction curves built from pyrosequencing data, which also highlighted a decrease of diversity along the gradient  $D0 > D3 > D5$  (Figure II-S1). The analysis of taxonomic composition evidenced significant differences between the three diversity levels (Figure II-S2), mainly due to an increase in the relative abundance of *Proteobacteria* and *Ascomycota* groups with increasing dilution ( $P < 0.05$ ) (Figure II-3).

### 2.3- Response of bacterial community structure to heat and mercury stress

Heat shock impacted bacterial community structure whatever the diversity level, as evidenced by the Euclidian distances calculated at T1, corresponding to the end of the 24h stress application (Figure II-4A). However, the amplitude of the modifications depended on the diversity level, with major changes observed when diversity was low ( $P < 0.05$ ). Two days after heat stress (*i.e.* T3) the bacterial genetic structure showed resilience at all three diversity levels, which decreased as the dilution increased (Figure II-4A). After heat shock and up to 40 days incubation, two patterns of community response could be distinguished between the lowest diversity D5 treatment which displayed significantly higher modifications than the D0 and D3 treatments, which were more resilient and not significantly different from each other. At the end of incubation, the genetic structure of the D0 bacterial communities was much closer to the corresponding control, and consequently more resilient than the other diversity levels (D3 and D5).

Spiking soil with mercury induced immediate changes in the genetic structure of bacterial communities in the D3 and D5 treatments (Figure II-4B), but not in D0. At T1, there was a clear gradient of community modifications ( $D5 > D3 > D0$ ) (Figure II-4B). Two distinct patterns of community response to heavy metal stress were then apparent depending on the level of diversity. The first pattern, represented by D0, was characterized by a resistant phase up to 10 days of incubation (*i.e.* no change in community structure) followed by a second phase during which gradual changes occurred in the D0 bacterial structure, leading to a very different genetic structure from the control at the end of incubation. The second pattern, observed in the D3 and D5 treatments, was characterized by large fluctuations in community changes throughout incubation, the magnitude of the changes increasing as the diversity decreased.





**Figure II-5:** Magnitude of the fungal genetic structure modifications during 80 days after (A) heat stress and (B) mercury pollution for the three levels of diversity ; D0 (black full line), D3 (grey dotted line) and D5 (light grey dashed line). Magnitude was determined by calculating the Euclidean distance between disturbed and control microcosms for each incubation time. Notation indicates a significantly different response in terms of genetic structure change between the three levels of diversity (Kruskal-Wallis test;  $P < 0.05$ ).

## **2.4- Response of fungal community structure to heat and mercury stress**

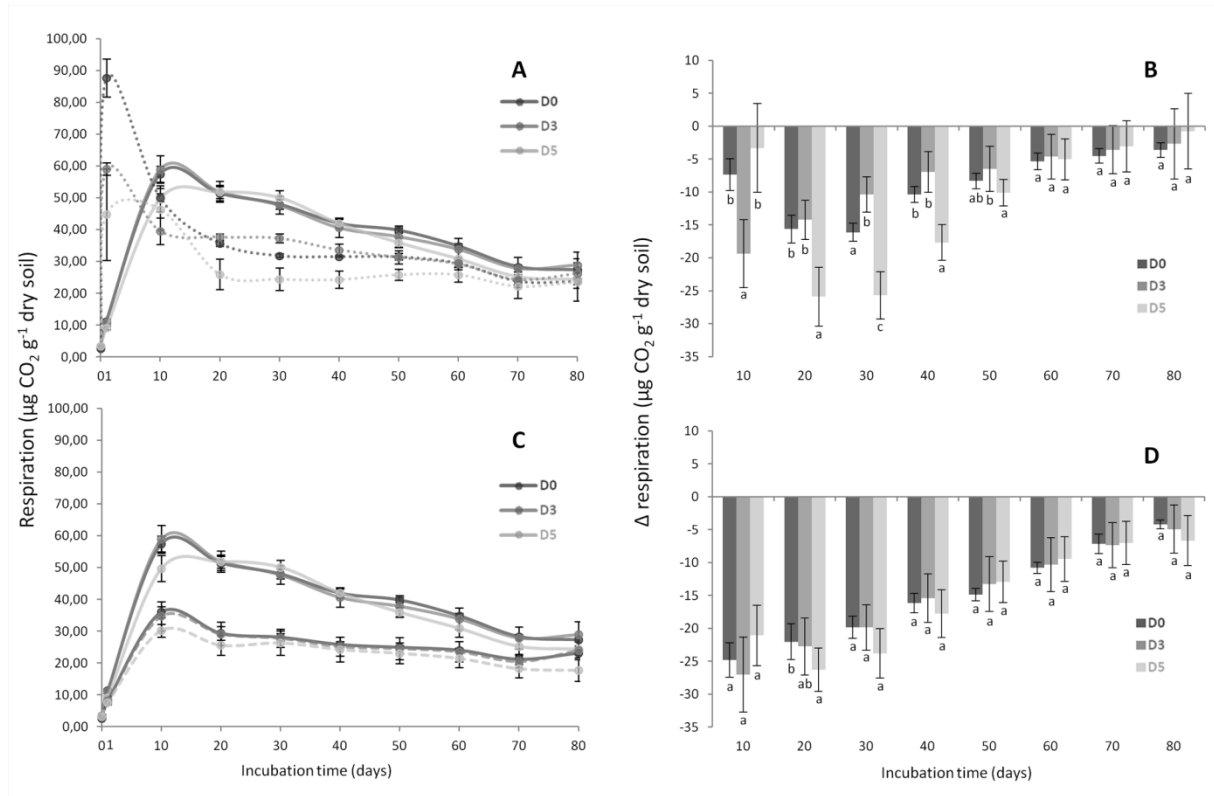
Heat shock resulted in large and early changes in the structure of fungal communities in D3 and D5, but not in D0 (Figure II-5A), as evidenced by the Euclidian distances calculated at T1 (corresponding to the end of the 24h stress application). The magnitude of the community modifications was dependent on the level of diversity and exhibited the following gradient  $D0 < D3 < D5$  ( $P < 0.05$ ). After heating, the short-term community response was also dependent on the diversity level, with no change occurring in D0 up to four days after heat stress, (*i.e.* T5, Figure II-5A) whereas large changes were observed in D3 and D5 during the same time. Considerable modifications occurred after this short-term response regardless of the diversity level. However, two patterns could be distinguished, with D0 and D3 following similar dynamics, different to D5. At the end of incubation, the structure of the fungal communities was very different from the control microcosms for all three levels of diversity.

Spiking soil with mercury induced large early changes (after 1 day) in the structure of fungal communities in D3 and D5 (Figure II-5B), but not in D0 where diversity was high. As for the bacterial communities, two patterns could be distinguished between (i) D3 and D5 which displayed large fluctuations in genetic structure throughout the incubation, and (ii) the high diversity treatment D0 that showed slight changes during the same period.

## **2.5- Response of soil respiration to heat and mercury stress**

Soil respiration in the control microcosms did not differ significantly between the three diversity levels at any time during incubation ( $P = 0.497$ ). At the end of incubation, the amount of  $\text{CO}_2$  released ranged from  $322 \pm 6$  for D5 to  $343 \pm 9 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$  dry soil for D0.

A strong increase in soil respiration occurred during the heat stress, whatever the level of diversity, the intensity decreasing with the decrease of diversity (Figure II-6A) ( $P < 0.01$ ). After heat stress, respiration decreased significantly ( $P < 0.01$ ) at all three diversity levels, to reach significantly lower values than the respective controls up to 60 days of incubation. D5 was significantly more impacted than D0 and D3 up to 50 days of incubation ( $P < 0.05$ ), as evidenced by the higher delta values recorded (Figure II-6B). From T50 until the end of the incubation, resilience of soil respiration was observed for the three level of diversity. At the end of incubation the amount of  $\text{CO}_2$  released by the heat-stressed microcosms was significantly higher in D0 and D3 ( $259 \pm 15$ , and  $257 \pm 3 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$  dry soil) than in D5 ( $218 \pm 29 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$  dry soil) ( $P < 0.05$ ).



**Figure II-6:** Soil respiration ( $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dry soil}$ ) over 80 days after (A) heat stress and (C) mercury pollution for the three levels of diversity with D0 (black), D3 (Grey) and D5 (light grey). Full lines represent control microcosms and dashed lines represent perturbed microcosms (mercury or heat stress). The difference between respiration ( $\Delta \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dry soil}$ ) of control and disturbed microcosms after (B) heat stress and (D) mercury pollution are shown for the three levels of diversity (D0; black, D3; grey and D5; (light grey). For each incubation time and level of diversity, values with different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Spiking soil with mercury resulted in a significant decrease in soil respiration ( $P < 0.01$ ) for all diversity levels compared to the control microcosms (Figure II-6C). At the end of incubation, the average amount of  $\text{CO}_2$  released in the mercury-polluted treatments ( $213 \pm 21 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dry soil}$ ) was significantly lower ( $P < 0.05$ ) than in the control treatments ( $336 \pm 17 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dry soil}$ ). However, the impact of mercury on soil respiration did not vary according to the level of diversity (Figure II-6D). As for heat stress, a resilience of soil respiration was observed at the end of incubation whatever the diversity level.



### 3- Discussion

The aim of our study was to see how microbial diversity might relate to the functional and structural stability of soil communities following stress application. To this end, our first challenge was to create a diversity gradient *i.e.* prepare different diversity treatments consisting of microcosms of the same soil accommodating the same microbial abundance, but different communities in terms of taxonomic richness and composition. For this, we used a dilution to extinction approach that has already proved successful (Wertz *et al.*, 2006; Baumann *et al.*, 2012; Philippot *et al.*, 2013). To obtain the same density in all three diversity levels, we relied on the fact that following the inoculation into a sterile soil, microbial communities are known to develop until reaching the soil carrying capacity (Wertz *et al.*, 2006, Baumann *et al.*, 2012). At T0 (*i.e.* end of the six weeks pre-incubation period) the bacterial and fungal densities as well as the microbial biomass did not differ between the three diversity treatments. In addition, whatever the diversity level microbial biomass in control treatment did not differ significantly with time, indicating that the 6 weeks pre-incubation truly allowed reaching the soil carrying capacity. For each treatment, no difference of biomass according to the diversity level was observed whatever the incubation time. We were therefore able to exclude that any further observed decrease in respiration rates with dilution would be due to a lower community biomass.

Dilution and pre-incubation led to the establishment of communities with contrasting structure and diversity, as evidenced by the A-RISA and pyrosequencing results obtained at T0. These changes might reflect a loss of microbial populations due to the actual dilution process, as suggested by the simplified ARISA profiles (data not shown) and the overall decrease in diversity index observed along the diversity gradient. However, our results also evidenced that the composition of the communities in the inoculated microcosms did not simply result from the arithmetic loss of microbial populations due to dilution (Franklin *et al.*, 2001). In particular, *Acidobacteria*, which represented 10% of the indigenous community (data not shown) were not retrieved in any of the diversity treatments whereas the abundance of *Proteobacteria*, which represented 47% of the indigenous community, increased along the diversity gradient to attain up to 95% of the sequences in D5. *Acidobacteria* are cosmopolitan soil bacteria (Barns *et al.*, 1999; Youssef & Elshahed, 2009) described as slow growing oligotrophs (Cleveland *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2011). Consequently, these organisms might be mainly k-strategists, and hence harbour poor competitiveness and colonization ability, which could explain their absence in the inoculated microcosms. Contrastingly,



*Proteobacteria* are described as fast-growing copiotrophs (Aneja *et al.*, 2006; Bernard *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 2010; Pascault *et al.*, 2013). As such they would be mainly r-strategists, harbouring strong competitiveness and colonization abilities, which could explain their preferential selection in the inoculated microcosms with increasing dilution.

Altogether these observations indicated that the differences in community composition at each diversity level resulted, in addition to the loss of populations with dilution, from the selection of r-strategist populations against the slower-growing k-strategist organisms, during soil recolonization. It is noticeable that, due to the dilution to extinction approach used, this selection has probably also been increased by the difference of microbial density between the three suspensions used for inoculation ( $D1 > D2 > D3$ ). In our study, it is likely that this could have conferred communities with a higher reactivity to the applied stresses.

### **3.1- Diversity affects population dynamics and functional response of microbial communities to heat shock**

During the heat shock, soil respiration increased significantly whatever the diversity level, in agreement with other studies (Bárcenas-Moreno & Bååth, 2009; Bérard *et al.*, 2011; Hamdi *et al.*, 2011). Higher C substrate availability corresponding to the recycling of cells killed by heating (Bérard *et al.*, 2011; Hamdi *et al.*, 2011), and improved soil enzymes activities may both have contributed to this respiration increase (Davidson & Janssens, 2006). The shift in bacterial and fungal community structure observed at T1 might reflect the killing of part of the community by heating. In other respects, no change in microbial biomass due to heating was recorded, thereby excluding the hypothesis that the increased respiration as well as differences between diversity treatments could be ascribed to an increase in microbial biomass and/or diversity-dependent sensitivity of the microbial communities to temperature, leading to the release of different amounts of necromass. However, the stimulation of soil respiration increased with soil diversity ( $D0 > D3 > D5$ ), highlighting that other mechanisms, driven by diversity, might also have been involved. For example, the complementarity function niche hypothesis (Salles *et al.*, 2009) states that species-rich communities can use more of the overall available resource since different species will colonize different habitats and use slightly different resources (Bell *et al.*, 2005). Facilitative interactions (*i.e.* decomposition products of one species acting as nutrient source for another species), which might be enhanced in a species-rich community, could also have contributed to the observed differences between the three diversity treatments (Bell *et al.*, 2005).





After heat shock, soil respiration decreased and did not recover the level of the controls in any of the diversity treatments, up to 60 days incubation. This lower respiration could be ascribed to nutrient depletion that occurred during the heating event due to increased microbial activity hence leading to limiting conditions for the microbial communities (Kirschbaum, 2006; Lützow & Kögel-Knabner, 2009; Hamdi *et al.*, 2011). In addition, the slight but not significant decrease of microbial biomass compared to control may also have contributed to the overall decrease of respiration observed. Interestingly, respiration in D5 remained lower than in D0 and D3, which no longer differed. This would indicate a greater resilience in species-rich communities. Again, the two diversity-driven mechanisms mentioned above might explain these results. Such mechanisms might confer, to species-rich communities, greater abilities to decompose the more recalcitrant C-substrates remaining after heating, in agreement with Bauman *et al.*, (2012) who recently demonstrated that lignin decomposition in soil increases with microbial diversity. Interestingly, the higher functional resilience in D0 and D3 was also associated with similar and more resilient patterns in the structural response of bacterial and fungal communities, as compared to D5, which displayed higher fluctuations and consequently lower resistance and resilience abilities. This highlights the increased structural stability with increased diversity and suggests that microbial diversity exerts a buffering effect on changes in soil carbon mineralization induced by temperature stress, in agreement with the insurance hypothesis (Loreau *et al.*, 2001). In addition, our results evidence the existence of a diversity decrease threshold, between D3 and D5, which shifted the structural and functional community response to soil heat (Scheffer *et al.*, 2001).

The buffering effect of microbial diversity seems to be time limited since, after incubation for 60 days, D5 finally reached the same level as in D0 and D3. It is likely that this functional resilience, which occurred after 60 days and uniformized the three diversity levels, does not involve diversity-driven mechanisms. We suggest that it might instead be ascribed to nutrient depletion during the incubation, which also occurred in the controls, and therefore led to similar limiting conditions in both control and stressed treatments. Such depletion of available substrates indeed is classically reported under laboratory conditions (Kirschbaum, 2006; Hamdi *et al.*, 2011). This hypothesis could explain why there was no difference in respiration rate between D0 and D3 after heating, probably due to greater nutrient depletion during heat-stress (Kirschbaum, 2006). A similar shift in the functional significance of diversity in relation to soil functioning by soil resource level has also been recently reported for processes and communities associated with denitrification in the nitrogen cycle (Philippot



*et al.*, 2013). In other respects, availability of readily decomposable substrates has also been demonstrated to determine the sensibility of soil respiration to temperature increase (Kirschbaum, 2006; Hamdi *et al.*, 2011). In this context, our results suggest that soil nutrient availability might be an important parameter regulating the significance of microbial diversity in the response of soil functioning to heat stress.

### **3.2- Diversity affects population dynamics but not the functional response of microbial communities to heavy metal pollution**

Spiking soil with mercury led to a significant decrease of soil carbon mineralization, in agreement with other studies (Müller *et al.*, 2002; Harris-Hellal *et al.*, 2009). Mercury is a highly toxic pollutant which binds to soil organic matter, and therefore has a close relationship with this component (Ranjard *et al.*, 1997; Grigal, 2003; Akerblom *et al.*, 2010). As a result, mercury might represent a kind of chemical protection, reducing the accessibility of soil organic matter to microbial decomposition. In addition, mercury has been shown to reduce the enzymatic activities involved in carbon mineralization (Harris-Hellal *et al.*, 2009). Amplitude of the respiration decrease did not vary with microbial diversity. This is not in agreement with other studies which demonstrated a positive relationship between microbial diversity and the resistance of soil respiration following residual stress caused by heavy metals such as copper (Griffiths *et al.*, 2000, 2001a; Degens *et al.*, 2001; Girvan *et al.*, 2005) or lead (Tobor-kaplon *et al.*, 2005). However, in these studies the pollutants were added together with organic matter such as plant residues. It is therefore likely that the discrepancy between our results and those in the literature can be attributed to the nutrient availability in soil which, in these studies, was high whereas no C-substrate was added in our experiment. This hypothesis is in agreement with the functional response to heat stress discussed above and suggests that the effect of microbial diversity on the response of soil functioning to heavy metal pollution is dependent on soil nutrient availability.

In contrast with the functional data, microbial diversity strongly influenced the structural response of bacterial and fungal communities to mercury. This discrepancy between functional and structural response emphasized the functional redundancy of soil microbial communities for carbon transformations in soil (Maron *et al.*, 2011). Similarly, Müller *et al.*, (2001) reported that long-term exposure to constant mercury stress shaped microbial diversity, but had only a slight effect on the functional potential of the community measured in terms of sole carbon source utilization. As observed for heat stress a threshold of diversity



decrease was observed, occurring right from the first dilution, which shifted the structural response of microbial communities to mercury pollution (Scheffer *et al.*, 2001). Again, structural stability was increased in species-rich communities, with a lag phase in the community response to mercury occurring only in D0 (up to 10 and 5 days for bacterial and fungal communities, respectively) whereas D3 and D5 displayed highly fluctuating dynamics throughout the incubation. The observed threshold, which was lower than in the heat treatment, might be due to the fact that mercury resistant/tolerant microorganisms are naturally very scarce in soil (Rasmussen and Sørensen, 2001; Ranjard *et al.*, 1997). Consequently, it is likely that these populations were lost as soon as the community was diluted. This is in agreement with the appearance of much more intense bands on the B-ARISA profiles (Figure II-S3) that occurred only in D0 after 10 days incubation. These bands could be attributed to the development of populations that initially shared resistant/tolerant mercury traits or acquired them *via* mechanisms of gene transfer (Smit *et al.*, 1998; Rasmussen & Sørensen, 2001).

In conclusion, our study shows that the functional and structural stability of microbial diversity increase with microbial diversity when soil undergoes disturbances, in agreement with the insurance hypothesis. Our results also suggest that a decrease of diversity might not be associated with gradual shifts in the functional and structural patterns of community response to heating and mercury pollution. Thus thresholds of diversity loss were demonstrated, the levels being dependent on the type of stress applied (mercury pollution < heating). Another important end-product of this study concerns the significance of diversity for the functional response of microbial communities to stress, this apparently being related to the amount of available soil resources. This latter finding could have important consequences in the context of global changes which are assumed to lead to increased frequency of extreme climatic events such as heat waves, but also to enhanced primary productivity and consequently nutrient loading of the soil due to increased atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations (Bardgett *et al.*, 2008). Our results suggest that this could, in turn, amplify the functional significance of the decrease/modification of microbial diversity induced by human activities.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Agence Nationale de Recherche (ANR) under the framework of the ANR Systerra project DIMIMOS, and by the European Commission within EcoFINDERS project (FP7-264465). This work benefited from the technical facilities of the



GenoSol platform of the infrastructure ANAEE-Services, as well as of the SOERE ACBB (<http://www.soere-acbb.com/fr/>).

## Supporting information

### Appendix S1: Experimental procedures

#### *S1.1- Soil*

Soil was collected from the top 10 cm of a Cambisol near Lusignan (South-West France: 46°25'12.91''N; 0°07'29.35''E, SOERE-ACBB, <http://www.soere-acbb.com/fr/>). Its physicochemical characteristics were as follows: 15% sand, 67% silt and 18% clay, pH<sub>H2O</sub> 6.6, 13.2 mg C g<sup>-1</sup> soil, and 1.5 mg N g<sup>-1</sup> soil. The soil was sieved to < 2mm, divided into microcosms consisting in 20g dry weight soil placed in 150-ml hermetically sealed plasma flasks, and then sterilized by  $\gamma$ -radiation (35 KGy; Conservatome, Dagneux, France). Before use, soil sterility was checked by counting the heterotrophic bacteria on Tryptic Soy Agar medium.

#### *S1.2- DNA extraction and microbial abundance characterization*

For each microcosm, DNA was extracted and quantified from 2 g soil using a single procedure standardized by the GenoSol platform (INRA, Dijon, France, [http://www.dijon.inra.fr/plateforme\\_genosol](http://www.dijon.inra.fr/plateforme_genosol)) (Terrat *et al.*, 2012). DNA concentrations of crude extracts were determined by electrophoresis in a 1% agarose gel using a calf thymus DNA standard curve. After quantification, the replicates were purified using a MinElute gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Bacterial and fungal densities were determined by respectively estimating the number of 16S- and 18S-rDNA genes, by quantitative PCR using a StepOne<sup>®</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with a SYBRGreen<sup>®</sup> detection system (Chemidlin Prévost-Bouré *et al.*, 2011, Plassart *et al.*, 2012). The presence of PCR inhibitors in DNA extracts from soil was estimated by (i) diluting the soil DNA extract and (ii) mixing a known amount of standard DNA (pGEM-T easy vector, Promega) with soil DNA extract prior to qPCR. No inhibition was detected in either case.

#### *S1.3- Pyrosequencing of 16S and 18S rRNA gene sequences*

Microbial diversity was determined at T0 (*i.e.* after the pre-incubation period) on the three levels of diversity (triplicates / level) by 454 pyrosequencing of ribosomal genes. A 16S rRNA gene fragment of the appropriate size (about 450 bases) and with sequence variability





for 454 pyrosequencing was amplified using the primers F479 (5'-CAGCMGCGYGCNGTAANAC-3') and R888 (5'-CCGYCAATTCMTTTRAGT-3'). For each sample, 5ng of DNA were used for a 25 µl PCR conducted under the following conditions: 94°C for 2 min, 35 cycles of 30 s at 94°C, 52°C for 30 s and 72°C for 1 min, followed by 7 min at 72°C. The PCR products were purified using a MinElute gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified using the PicoGreen staining Kit (Molecular Probes, Paris, France). Similarly, an 18S rRNA gene fragment of about 350 bases was amplified using the primers FR1 (5'-ANCCATTCAATCGGTANT-3') and FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') (Chemidlin Prévost-Bouré *et al.*, 2011) under the following PCR conditions: 94°C for 3 min, 35 cycles of 1 min at 94°C, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by 5 min at 72°C. A second PCR of 9 cycles was then conducted under similar PCR conditions with purified PCR 16S- and 18S-rDNA products and ten base pair multiplex identifiers added to the primers at 5' position to specifically identify each sample and avoid PCR biases. Finally, the PCR products were purified and quantified as previously described. Pyrosequencing was then carried out on a GS FLX Titanium (Roche 454 Sequencing System).

#### *SI.4- Bioinformatics analysis of 16S and 18S rRNA gene sequences*

Bioinformatics analyses were done using the GnS-PIPE developed by the GenoSol platform (INRA, Dijon, France) and initially described by Terrat *et al.*, (2012). First, all reads were sorted according to the chosen multiplex identifiers. Then, raw reads were filtered and deleted: (a) if the exact primers were not found at the beginning and at the end of the sequence, (b) if the sequences contained any ambiguity (Ns), (c) if its length was below 350 and 300 bases for 16S and 18S reads respectively. A PERL program was then applied to obtain strict dereplication. The dereplicated reads were then aligned using Infernal alignments (Cole *et al.*, 2009) and clustered at 95% sequence similarity into operational taxonomic units (OTU) using a PERL program that clusters rare reads to abundant ones, and do not count differences in homopolymer lengths. Another homemade filtering step was then applied to eliminate potential sources of errors (*e.g.*, PCR chimeras, sequencing errors, OTU overestimation), based on taxonomic results (see details below). In order to efficiently compare the datasets and avoided biased community comparisons, high-quality reads were reduced by random selection closed to the lowest datasets (19,000 and 21,000 reads for 16S and 18S rRNA gene sequences respectively). Kept reads were then compared for taxonomy-based analysis against the RDP database (Release 9) using the RDP Muticlassifier



(<http://rdp.cme.msu.edu/>) for 16S sequences, and against a cleaned version of the Silva database (version r111 using the EMBL taxonomy, <http://www.arb-silva.de/>) for 18S sequences. Finally, diversity indexes were determined using the detected taxonomic groups at the genus level. The maximum numbers of OTU, Shannon (H') and Evenness (J) indexes were used as indicators of soil microbial richness, diversity and structure, respectively. The raw data sets are available on the EBI database system under project accession number PRJEB4260.

#### *S1.5- Automated-RISA fingerprinting of bacterial and fungal communities*

ARISA was performed to characterize the diversity of microbial communities at each sampling date (0, 1, 3, 5, 10, 20, 40, 80 days of incubation) and for each treatment and diversity level. The bacterial and fungal ribosomal Intergenic Spacer (IGS) were amplified from DNA extracts by PCR using the primers L-D-Bact-132-a-A-18/S-D-Bact-1522-b-S-20 and ITS1F/ITS4, respectively. The S-D-Bact-1522-b-S-20 and ITS4 were labelled at the 5' end with IRD800 fluorochrome and the resulting amplicons were detected with a LiCor® DNA sequencer (ScienceTec, Les Ulis, France) (Ranjard *et al.*, 2006).

#### *S1.6- CO<sub>2</sub> measurements*

At each sampling date (0, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 days of incubation), the headspaces were sampled in 10 ml Terumo evacuated blood collection tubes for measurement of the CO<sub>2</sub> concentration. Since the microcosms were hermetically-sealed and aerated by flushing with air at each sampling date, the concentrations measured corresponded to the CO<sub>2</sub> accumulated in the microcosm headspace between two sampling dates. CO<sub>2</sub> concentrations were obtained from an Agilent 7890A GC system equipped with a thermal conductivity detector coupled to an automatic sampler (Agilent G1888 headspace). The GC system was calibrated using multipoint CO<sub>2</sub> gas standards prepared by a GasMix (Alytech, France).

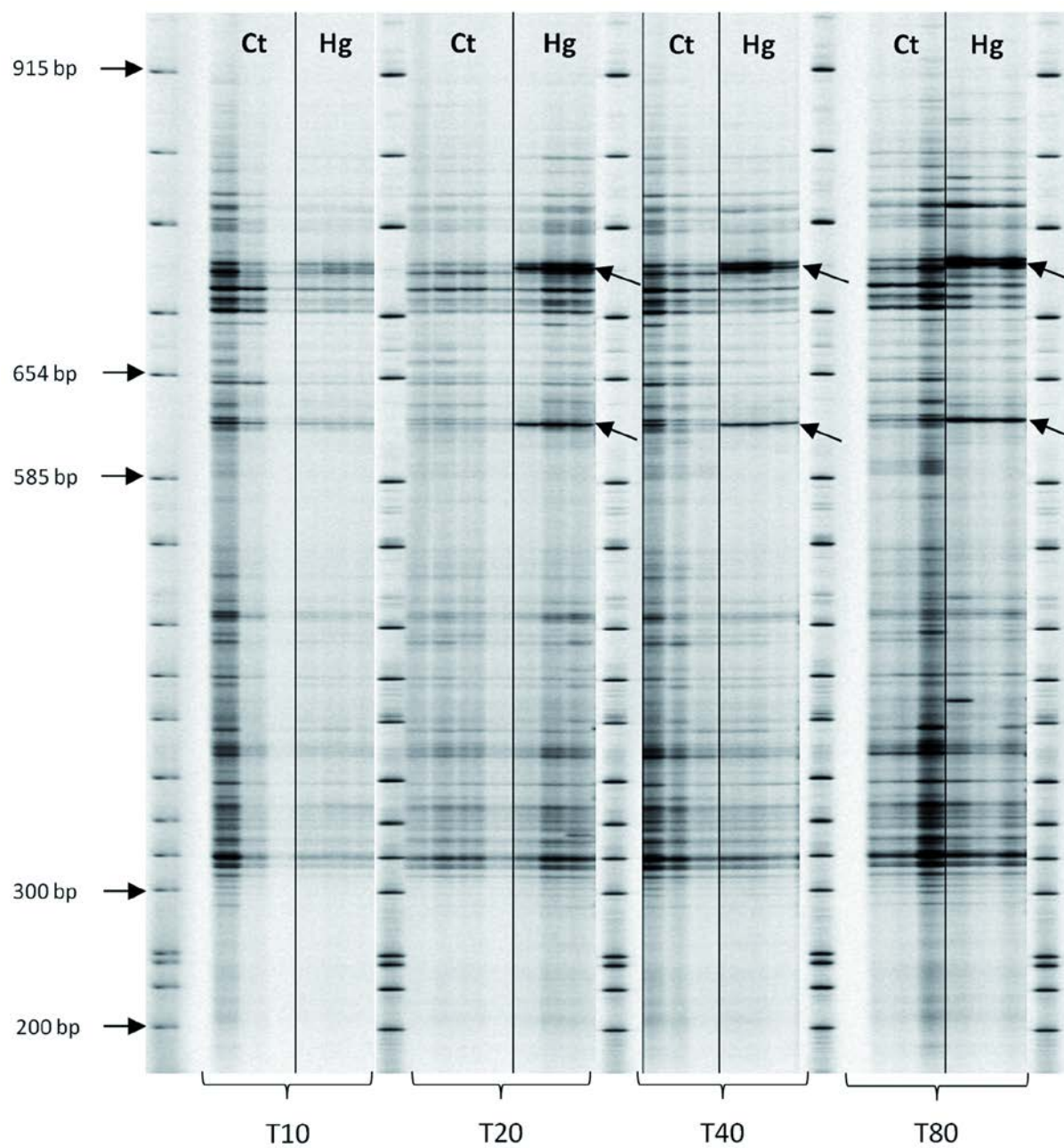
#### *S1.7- Statistical analysis*

Data obtained from the 1D-scan software were converted into a table summarizing the band presence (peak) and intensity (Gaussian area of peak) using the PrepRISA program (Ranjard *et al.*, 2003) under R free software version 2.10.1. To ensure a robust analysis, 100 bands were integrated for Bacterial-ARISA and 60 bands for Fungal-ARISA with a 2 bp resolution. Principal component analysis (PCA) and between-group analysis (BGA) on a B-ARISA and F-ARISA covariance matrix were performed on the data matrix (bacterial or



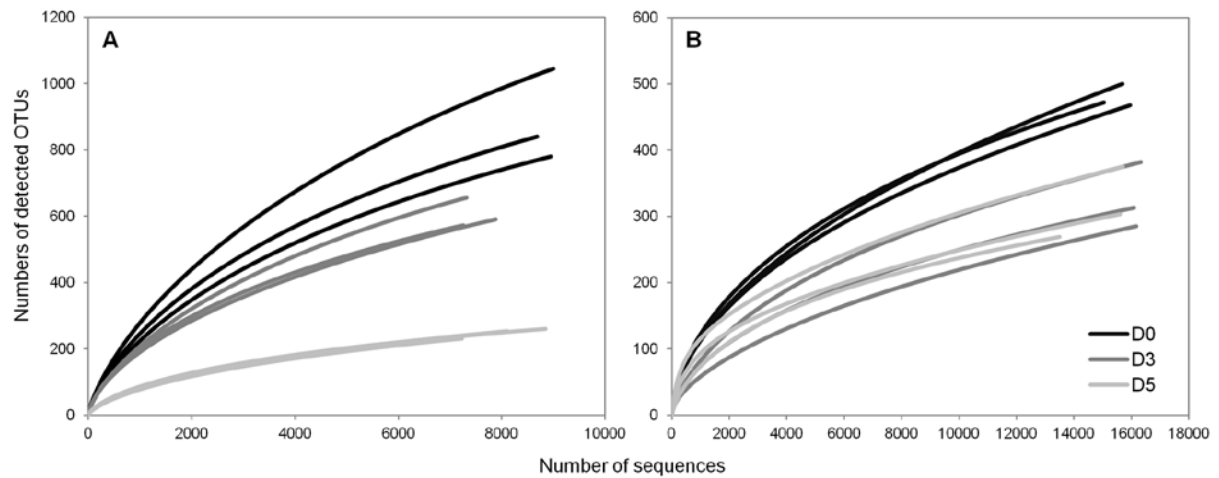
fungus communities as rows and bands as columns). The coordinates of the first four principal components of BGA were analyzed by calculating the Euclidean distance (Eudist) between the treatment and the corresponding controls for each incubation time and diversity level. This genetic distance was interpreted as the magnitude of genetic structure modifications induced by the stresses and was calculated as follows. Magnitude of modifications, example of calculation for each incubation time = [Average of Inter Eudist (treated microcosms/control microcosms)] - [((Average of Intra Eudist treated microcosms) + (Average of Intra Eudist control microcosms))/2] (Bressan *et al.*, 2008). PCA, BGA and Euclidean distance were performed using the ADE-4 software (Thioulouse *et al.*, 1997).

Density, molecular biomass, diversity indexes and magnitude of microbial genetic structure were compared between the three levels of diversity by applying the nonparametric Kruskal-Wallis test. Differences in respiration between control and stressed microcosms were compared by nonparametric Kruskal-Wallis test. Differences between means were tested by paired multiple comparisons with Bonferroni correction ( $P < 0.05$ ). For the taxonomic and carbon balance data, statistical treatments were conducted by two-way ANOVA and the differences between them by Fischer test ( $P < 0.05$ ). All these statistical calculations were carried out using XLSTAT software (Addinsoft®).

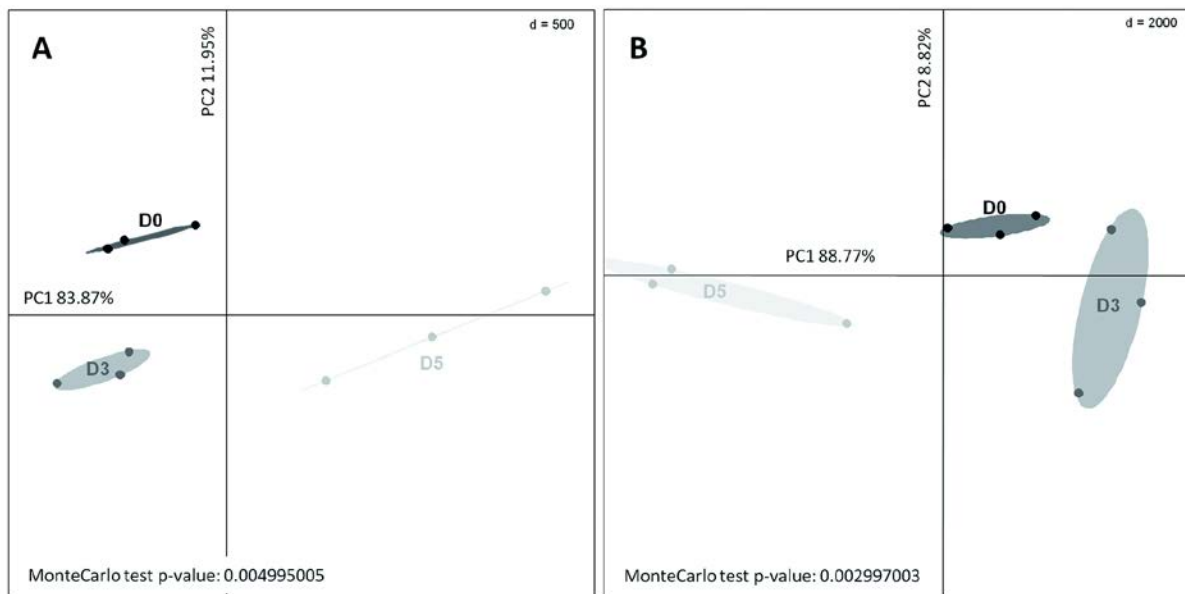


**Figure II-S3:** Bacterial-ARISA profiles obtained after 10, 20, 40 and 80 days of incubation for the level of diversity D0. For each sampling date, 3 replicates of control soils (**Ct**) and soils spiked with mercury (**Hg**) were prepared. Arrows indicate significant modifications between profiles (*e.g.* common bands with different relative abundance).

## Appendix S2: Supplementary Figures



**Figure II-S1.** Rarefaction curves determined by pyrosequencing of the (A) 16S- and (B) 18S-rDNA genes obtained for three replicates of each level of diversity, based on randomly selected and filtered sequences. Rarefaction curves were determined using clustering at 95% of similarity.



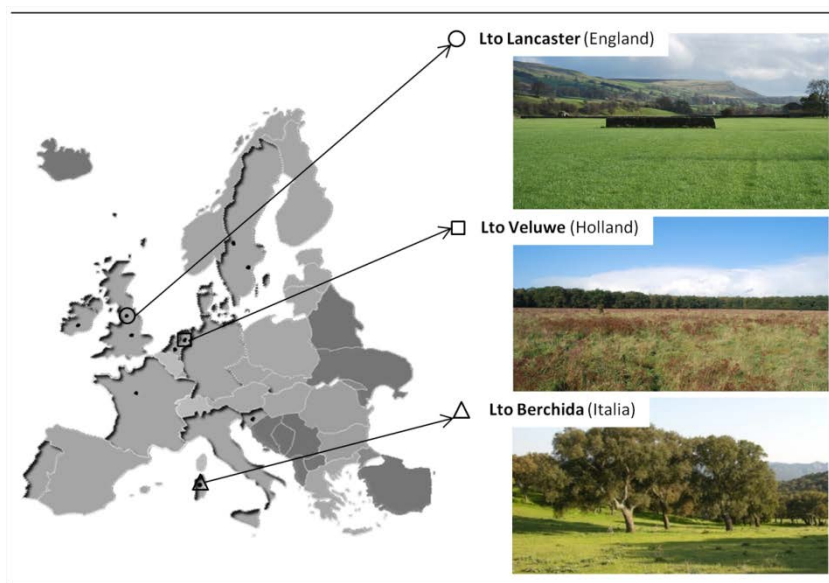
**Figure II-S2.** Factorial map of: (A) bacterial and (B) fungal phylogenetic community composition (*phyla*) at T0. Monte Carlo tests were performed with 1000 permutations to confirm the significance of the discriminated clusters.





# **Chapitre III:**

Influence de la diversité microbienne sur le turnover de la  
matière organique du sol



**Figure III-1:** Localisation des trois sites expérimentaux Européens. Les sites choisis sont caractérisés par un gradient d'intensification d'usage des sols avec : (□) le site de **Veluwe** représenté par chronosequence d'abandon de l'utilisation des terres (Hollande), (Δ) le site de **Berchida** représenté par une intensification de l'utilisation des terres dans une région méditerranéenne (Sardaigne, Italie) et (○) le site de **Lancaster** représenté par des systèmes de prairies avec différentes intensités de gestion (Yorkshire Dales National Park, northern England).

Nous avons vu dans le chapitre 2 que la diversité microbienne était un paramètre déterminant pour la stabilité structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes du sol. Ce premier travail réalisé dans des conditions expérimentales très simplifiées représente une preuve de concept intéressante sur la relation diversité/stabilité/activité microbienne. Toutefois, les conclusions de ce travail doivent être testées dans des conditions plus « réalistes » afin d'évaluer leur généralité. C'est dans cet objectif que s'inscrivent les travaux présentés dans ce chapitre.

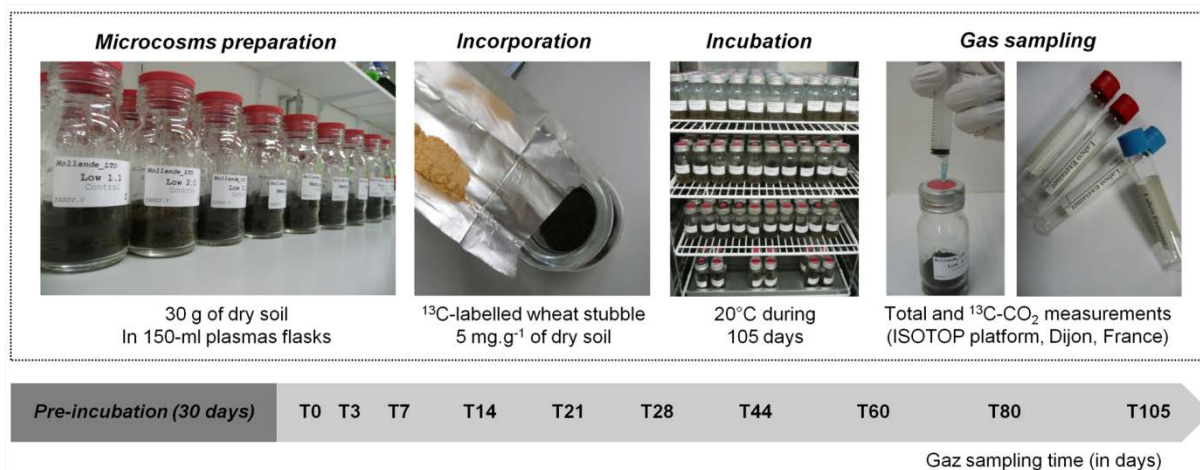
Dans cette seconde partie expérimentale de ma thèse, nous avons focalisé nos efforts sur la démonstration du lien entre la diversité microbienne et le turnover de la matière organique du sol. Comme évoqué en synthèse bibliographique [Chapitre I, section 3.5], les résultats contradictoires des travaux examinant cette relation ne permettent pas d'établir un consensus clair quant à l'effet de la diversité sur les processus biologiques associés au cycle du carbone. L'idée généralement admise par la communauté scientifique est que la fonction de minéralisation de la matière organique est très redondante au sein des communautés microbiennes du sol, et que par conséquent la diversité microbienne est un paramètre neutre pour la détermination des flux de carbone dans le sol (Nannipieri *et al.*, 2003; Wertz *et al.*, 2006). Toutefois, nous avons bien vu dans le travail précédent que les flux de carbone émis semblent liés à la diversité des communautés microbiennes du sol.

Dans ce contexte, les objectifs du troisième chapitre étaient :

- 1- d'évaluer l'impact d'un gradient d'intensification des pratiques agricoles sur les communautés microbiennes du sol (richesse, evenness, composition) ;
- 2- de hiérarchiser les paramètres biotiques et abiotiques expliquant la minéralisation de la matière organique

Notre hypothèse était que l'intensification des pratiques agricoles pouvait moduler la diversité microbienne (augmentation ou diminution) et que cette modification pouvait avoir des effets significatifs sur les processus de décomposition de la matière organique du sol.

Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisé un échantillonnage provenant de trois sites expérimentaux Européens (Sardaigne, Angleterre et Hollande, Figure III-1), chacun caractérisé par un gradient d'intensification d'usage du sol (représenté par trois niveaux : faible, moyen, fort). Les sols ont été incubés en microcosmes et des résidus de blé marqués ( $^{13}\text{C}$  à 5%) ont été apportés pour chaque modalité de chaque site. La diversité des



**Figure III-2:** Préparation des microcosmes de sol et suivi de la minéralisation de la matière organique.

communautés de bactéries et de champignons a été caractérisée par séquençage massif des ADN ribosomiques. Le suivi de la minéralisation de la matière organique apportée a été réalisé sur une période de 105 jours *via* la quantification des gaz CO<sub>2</sub> et <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> émis (Figure III-2). Afin d'expliquer les différentes minéralisations observées entre les sols, nous avons réalisé une analyse en partition de variance dans le but de hiérarchiser les paramètres biologiques, physiques et chimiques en fonction de leurs contributions relatives dans les activités mesurées (minéralisation de la matière organique du sol, du résidu de blé, priming effect).

Cette étude sera présentée sous la forme d'un article scientifique soumis dans la revue *The ISME Journal*.



# **Shifts in microbial diversity through land use intensity as drivers of C-cycling in soil**

Vincent Tardy<sup>1</sup>, Aymé Spor<sup>1</sup>, Olivier Mathieu<sup>2</sup>, Jean Lévêque<sup>2</sup>, Sébastien Terrat<sup>3</sup>, Pierre Plassart<sup>1</sup>, Tiffanie Reignier<sup>1</sup>, Richard Bardgett<sup>4</sup>, Wim van der Putten<sup>5</sup>, Pier Paolo Roggero<sup>6</sup>,  
Philippe Lemanceau<sup>1</sup>, Lionel Ranjard<sup>1,3</sup> & Pierre-Alain Maron<sup>1,3</sup>

*<sup>1</sup>INRA, UMR 1347 Agroecology, Dijon, France*

*<sup>2</sup>UMR Université de Bourgogne, Biogéosciences 5561, Dijon, France*

*<sup>3</sup>INRA, Plateforme GenoSol, UMR1347 Agroecology, Dijon, France*

*<sup>4</sup>Soil and Ecosystem Ecology, Lancaster University, Lancaster, UK*

*<sup>5</sup>Department of Multitrophic Interactions, Netherlands Institute of Ecology, The Netherlands*

*<sup>6</sup>Dipartimento di Scienze Agronomiche e Genetica Vegetale Agraria, University of Sassari,  
Italy*

**Running title:** Microbial diversity drives carbon cycling in soil

**Correspondence:** P.A. Maron, INRA, UMR1347 Agroecology, 17 rue Sully, 21000, Dijon, France

Email: [pierre-alain.maron@dijon.inra.fr](mailto:pierre-alain.maron@dijon.inra.fr)





## **Abstract**

Land use intensification shifts the biomass, activity, and structure of soil microbial communities. However, the impact of land use intensity on the metrics of microbial diversity (*i.e.* richness and evenness) is poorly documented. Consequently, deciphering the relationships between land use intensity and microbial diversity, and the functional significance of diversity changes remains challenging. Here, we coupled molecular characterization of microbial diversity with measurements of C mineralization on soils obtained from three European LTOs, each representing a gradient of land use intensity (low, medium, high) under various environmental conditions. Bacterial and fungal diversity were characterized by high throughput sequencing of ribosomal genes. C-cycling activities (*i.e.*, native soil organic matter, plant residues mineralization, priming effect) were measured by monitoring  $^{12}\text{C}$ - and  $^{13}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  release after soils had been amended, or not, with  $^{13}\text{C}$ -labelled wheat residues. Biological and physicochemical soil parameters were ranked according to their relative contribution to these activities, by variation partitioning analysis. Diversity was increased under medium, as compared to low and high, land use intensity in each LTO. This pointed to a hump-backed relationship between microbial diversity and disturbance, and indicated that optimal management of microbial diversity might not be achieved under the least intensive agriculture. Microbial richness was the best predictor of the activities, explaining 42, 50 and 80% of the variations in basal, total and wheat residues mineralization, respectively, the relative involvement of bacterial *vs.* fungal diversity varying according to the activity. These results contribute to our understanding of (i) the regulation of microbial diversity by land use, and (ii) the relative importance of microbial diversity for C-cycling in soil.



## 1- Introduction

Soil is the site of numerous biological and ecological processes resulting from the complex taxonomic and functional assemblages of the indigenous biological communities (Coleman & Whitman, 2005). In recent decades, human societies have adopted policies for land use intensification based on the conversion of complex natural ecosystems to simplified managed ecosystems, intensification of resource use through the mechanization of agricultural practices, and increased use of inputs such as fertilizers and pesticides (Tscharrntke *et al.*, 2005; Dallimer *et al.*, 2009). This was originally motivated by the need to improve production to meet growing demands for food. However, it also led to profound alterations of the soil physicochemical properties (Giller *et al.*, 1997), as well as loss of above- and below-ground biodiversity (Giller *et al.*, 1997; Thiele-Bruhn *et al.*, 2012). For a long time, the development of intensive agriculture was not impeded by this negative impact since the replacement of self-regulation of functions through biodiversity was assumed to be advantageously offset by chemical and mechanical inputs. Today, however, this viewpoint is challenged by the increasing awareness that the sustainability of agricultural systems, in terms of their capacity to maintain functions and ecosystem services, is compromised by the disruption of physicochemical and biological soil properties (Thiele-Bruhn *et al.*, 2012). This has evidenced the need to define new modes of land use management, which are adapted to the preservation and sustainable use of biodiversity to promote the driving of functions by biodiversity and reduce the use of chemical and mechanical inputs. To attain this objective, however, our ability to predict the effects of agricultural practices on soil biodiversity and functioning will need to be improved.

Microbial diversity, with its hundreds to thousands of taxa per gram of soil, dominates soil biodiversity (Torsvik and Øvreås, 2002) and contributes to key soil functions (*e.g.* soil organic matter turnover) involved in soil fertility, environment and water quality. Whereas the impacts of increasing land use intensity on plant and faunal communities have been documented (Giller *et al.*, 1997; Beare *et al.*, 1997; Thiele-Bruhn *et al.*, 2012), the effects of land use intensity on soil microbial diversity remain largely unknown. This question needs to be addressed not only because of the intrinsic value of microbial diversity, in terms of a natural patrimony that needs to be preserved, but also because variations in the “amount” of soil diversity are likely to have significant repercussions in terms of soil nutrient cycling (Baumann *et al.*, 2012; Philippot *et al.*, 2013), pathogens management (Vivant *et al.*, 2013), and stability to environmental changes (Tardy *et al.*, 2013). Recent studies based on estimates



of the metrics of microbial diversity in terms of richness (number of species) and evenness (equality or distribution of individuals) in samples obtained over gradients of land use intensity suggest that microbial diversity may not follow a linear negative relationship to land use intensity, but instead a hump-backed relationship (Connell, 1978; Grime, 1997; Álvarez-Molina *et al.*, 2012), with lower values at low and high intensity, and higher values at moderate intensity (Acosta-Martínez *et al.*, 2008; Jangid *et al.*, 2011; Shange *et al.*, 2012). However, each of these studies focused only on the bacterial community in a single soil type, which limits the applicability of the conclusions. In addition they did not couple biodiversity measurements with estimates of soil functioning, and the functional significance of microbial diversity changes in response to land use remains an open question. Thus, new studies are needed to improve our knowledge of the patterns of microbial diversity and activity response to land management intensity.

In this study, we investigated the regulation of microbial (bacteria and fungi) diversity and activity by land use intensity. Our hypothesis was that agricultural practices representing intermediate stress intensity might allow microbial diversity to increase. In addition, we assumed that the regulation of microbial diversity through cropping intensity might have a significant effect on transformations of soil organic matter, a major function driven mostly by fungal and bacterial communities. To test these hypotheses, we relied on three Long Term Observatories (LTOs) in different parts of Europe, each offering a gradient of intensification of land use and covering a range of pedoclimatic properties. The impact of land use on microbial diversity was assessed with a meta-barcoded pyrosequencing technique targeting ribosomal genes. This new technology, by generating several thousand sequences, provides an accurate estimate of microbial diversity (*i.e.* richness, evenness). Changes in soil respiration patterns were measured by monitoring  $^{12}\text{C}$ - and  $^{13}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  release after the soils had been amended or not with  $^{13}\text{C}$ -labelled wheat residues. The resulting data obtained for microbial diversity,  $\text{CO}_2$  emission, soil chemical and physical properties were analysed together, using variation partitioning to rank the biological, chemical and physical soil parameters according to their relative contribution to C-cycling in soil.



## 2- Materials and methods

### 2.1- Experimental sites, soil sampling and analysis

Our study involved soils obtained from three Long Term Observatories (LTOs), characterized by different gradients of soil management intensity (low, medium and high). The Veluwe LTO is located in the Veluwe National Park (Netherlands) and is composed of abandoned agricultural plots, which have been turned into semi-natural grasslands. The gradient of intensification is based on three true replicates of long term abandoned grasslands (abandoned for 26-29 years, Ve-low), three distinct medium term abandoned grasslands (16-23 years, Ve-med) and three distinct short term permanent grasslands (6 to 9 years, Ve-high). The Berchida LTO is located in the northern hills of Sardinia (Italy) and characterized by an agro-forest ecosystem (Lagomarsino *et al.*, 2011). The low intensity treatment (Be-low) is a long-term (over 80 years) abandoned grassland plot, which has been naturally recolonized by cork oaks, resulting in a forest harbouring natural grass patches. The medium intensity treatment (Be-med) is a wooded pasture (25-50 % tree cover of cork oaks) grazed and periodically cultivated (5-10 years) to grow annual forage crops. The high intensity treatment (Be-high) consists of intensively managed permanent grassland, grazed and periodically cultivated (1-5 years) to grow annual forage crops. Sampling zones were chosen in such a manner that one sample could be taken in a grass patch. Three composite soil samples (pseudo-replicates) of five soil cores were taken from each of the three plots in November 2011. The Lancaster LTO is located in the Yorkshire Dales National Park, 60 km northeast of Lancaster (United Kingdom) and corresponds to a series of mesotrophic grasslands under increasing levels of management intensity. The levels of intensification are represented by grazed natural grassland for low intensity (La-low), grazed and fertilized natural grassland for medium intensity (La-med) and a grazed and fertilized cultivated grassland (tillage + seeding) for high intensity (La-high). Three composite samples (pseudo-replicates) of five soil cores were taken from each plot in October 2011.

Thus each soil sample, from all LTOs, consisted of a composite of five soil cores taken to a depth of 20 cm during autumn 2011. After sampling, the soil samples were sieved to 2mm. One portion of the soil was then stored at 4°C before being incubated, and another portion was dried for analysis of physicochemical and biological parameters. Particle size distribution, pH, soil organic content (SOC), soil total nitrogen (total N), soil C/N ratio and





Cation Exchange Capacity (CEC) were determined by the Soil Analysis Laboratory of INRA (ARRAS, France, <http://www.lille.inra.fr/las>).

## 2.2- Soil microcosms

Microcosms were set up by placing 30 g of equivalent dry soil in 150-ml hermetically sealed plasma flasks. These soil microcosms were supplemented with sterile water to attain 60% soil water-holding capacity. After 3 weeks pre-incubation at 20°C, the microcosms were then either amended with  $^{13}\text{C}$ -residues of wheat (5 mg g<sup>-1</sup> of dry weight soil) which had been finely ground in a bead beater to obtain a powder (C:N ratio of wheat residues = 77.7, and  $^{13}\text{C}$  labelling = 7.01%), or were not amended (control). In total there were 162 microcosms corresponding to the 3 LTOs  $\times$  3 levels of intensity  $\times$  3 plots/level  $\times$  2 treatments (amended or control)  $\times$  3 replicates/treatment. The microcosms were incubated in the dark for 105 days under controlled temperature (20°C) and moisture conditions.

## 2.3- Total and $^{13}\text{C}$ -CO<sub>2</sub> measurements

CO<sub>2</sub> (total and  $^{13}\text{C}$ -CO<sub>2</sub>) was measured after 0, 3, 7, 14, 21, 28, 44, 60, 80, 105 days of incubation on triplicates of the amended and control microcosms. At each sampling date, the gaseous phases were sampled in 10 ml airtight flasks to measure the CO<sub>2</sub> concentration and in 12 ml airtight flasks to determine the carbon isotope abundances. Since the microcosms were hermetically sealed and aerated by flushing with air at each sampling date, the measured concentrations corresponded to the CO<sub>2</sub> accumulated in the microcosm headspace between two sampling dates. CO<sub>2</sub> concentration was obtained from an Agilent 7890 GC system equipped with a thermal conductivity detector coupled to an automatic sampler (Agilent G1888 Headspace), as described previously (Pascualt *et al.*, 2013). For isotopic CO<sub>2</sub>, a pure bottle (CO<sub>2</sub> > 99.999%, N48, Air Liquide, France), previously calibrated against a certified isotopic standard ( $\delta^{13}\text{C} = -25.5 \pm 0.2\text{‰}$  vs. PDB, ISO-TOP, Air Liquide), was selected as internal standard. Gas samples were injected into the trace gas with an air gas syringe.  $^{13}\text{C}$  labelling of the plant residues allowed separation of the soil C (R<sub>s</sub>) and plant residue (R<sub>r</sub>) respiration ( $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ soil}$ ) using the following mass balance equations:

$$R_s + R_r = R_t \text{ and } R_s \times A_s^{13} + R_r \times A_r^{13} = R_t \times A_t^{13}$$

where  $A_s^{13}$  is the  $^{13}\text{C}$  abundance regardless of soil carbon,  $A_r^{13}$  the  $^{13}\text{C}$  abundance of plant residue,  $R_t$  the total CO<sub>2</sub> emitted by soil with plant residue and  $A_t^{13}$  its  $^{13}\text{C}$  abundance.

The priming effect (PE) induced by the addition of plant residue was calculated as:



$$PE = (R_s \text{ soil with plant residue}) - (R_s \text{ control soil})$$

where  $R_s$  control soil is the  $CO_2$  emitted by the soil in non-amended microcosms.

#### **2.4- DNA extraction and molecular microbial biomass determination**

At T0 (*i.e.* after the pre-incubation), microbial DNA was extracted from 1 g of soil from each triplicate microcosm of each intensity level from each LTO using the ISO-10063 procedure (Petric *et al.*, 2011) which had been slightly modified (Plassart *et al.*, 2012) to include a mechanical lysis step, using fastPrep<sup>®</sup>-24 instead of the recommended mini bead-beater cell disruptor. DNA concentrations of crude extracts were determined by electrophoresis in a 1% agarose gel using a calf thymus DNA standard curve, and used as estimates of microbial molecular biomass (Dequiedt *et al.*, 2011). After quantification, DNA was purified using a MinElute gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

#### **2.5- Pyrosequencing of 16S and 18S rRNA gene sequences**

Bacterial and fungal diversities were determined at T0 for the three levels of land use intensity for each LTO (triplicates/level of LTO) by 454 pyrosequencing of ribosomal genes. For bacteria, a 16S rRNA gene fragment with sequence variability and the appropriate size (about 450 bases) for 454 pyrosequencing was amplified by PCR using the primers F479 and R888. For fungi, an 18S rRNA gene fragment of about 350 bases was amplified using the primers FR1 and FF390. Primers and PCR conditions were as described previously (Tardy *et al.*, 2013). The PCR products were purified using a MinElute gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified using the PicoGreen staining Kit (Molecular Probes, Paris, France). A second PCR of 9 cycles was then conducted under similar PCR conditions with purified PCR products and ten base pair multiplex identifiers added to the primers at 5' position to specifically identify each sample and avoid PCR biases. Finally, the PCR products were purified and quantified as previously described. Pyrosequencing was then carried out on a GS FLX Titanium (Roche 454 Sequencing System).

#### **2.6- Bioinformatics analysis of 16S and 18S rRNA gene sequences**

Bioinformatics analyses were done using the GnS-PIPE developed by the GenoSol platform (INRA, Dijon, France) and initially described by Terrat *et al.* (2012). First, all reads were sorted according to the chosen identifiers sequences. The raw reads were then filtered and deleted based on their: (a) length, (b) number of ambiguities (Ns), and (c) primer(s)



sequence(s). PERL programs were then applied to obtain strict dereplication, alignment of reads using infernal alignments (Cole *et al.*, 2009) and clustered at 95% sequence similarity into operational taxonomic units (OTU) that cluster rare reads with abundant ones, and do not count differences in homopolymer lengths. Another homemade filtering step was then applied to eliminate potential sources of errors (e.g., PCR chimeras, sequencing errors, OTU overestimation). In order to efficiently compare the datasets and avoid biased community comparisons, the samples reads were reduced by random selection closed to the lowest datasets (5,000 and 12,000 reads for 16S and 18S rRNA gene sequences respectively). The retained high-quality reads were used for: (i) taxonomy-independent analyses, to determine several diversity and richness indices using the defined OTU composition, and (ii) taxonomy-based analysis using similarity approaches against dedicated reference databases from SILVA. The raw data sets are available on the EBI database system under project accession number [...].

## **2.7- Statistical analysis**

Differences in microbial communities structure between land use strategies within a given LTO and between the LTOs were characterized using UniFrac distances (Lozupone & Knight, 2005). Non Metric Multidimensional Scaling (NMDS) was then used to graphically depict differences between microbial communities. The significance of the observed clustering of samples on the ordination plot was assessed by an Analysis Of SIMilarity (ANOSIM, 999 permutations).

The significance of the differences in C-cycling activities and diversity indices (Richness and 1/Simpson) between land use management strategies in the different LTOs was determined with a two-way ANOVA. Physicochemical parameters were compared between the levels of intensification for each LTO with the non parametric Kruskal-Wallis test. All these analyses were carried out using XLSTAT software (Addinsoft®).

Multiple linear regressions were used to determine the abiotic and biotic properties significantly affecting the respiration parameters measured in the different LTOs. In total, 10 soil physicochemical properties (Table III-1) and 9 biotic variables (microbial biomass, fungal and bacterial diversity indices including richness, evenness, Shannon and 1/Simpson) were selected. The respiration parameters (R<sub>t</sub>, R<sub>r</sub>, PE and R<sub>s</sub> control) were obtained from the log10-transformed areas under the cumulated CO<sub>2</sub> emission kinetics curves up until 105 days of incubation. All the explanatory (biotic and abiotic) variables were checked for collinearity



(Supplementary Figure III-S3) since this can inflate the variance of the regression coefficients in the models, leading to reduced precision in predicting the response variables (Ramette, 2007). When explanatory variables were strongly correlated, the ones to be kept in the multiple regression model were selected on the basis of *a priori* knowledge of the experimental system. All quantitative explanatory variables were transformed by applying Box-Cox transformation prior to the analyses (Cook and Weisberg, 1999). The significant explanatory variables for each respiration parameter were chosen by backward model selection and by minimizing the Akaike Information Criterion (AIC). Statistical significance was assessed by 1999 permutations of the reduced model. All these analyses were performed with the R free software (<http://www.r-project.org/>).



**Table 1:** Top soil (0-10 cm layer) physicochemical parameters according to land use management of LTO.

ID Sample <sup>b</sup>	Clay (< 2µm) g/kg	Fine silt (2/20 µm) g/kg	Coarse silt (20/50 µm) p/kg	Fine sand (50/200 µm) g/kg	Coarse sand (200/2000 µm) g/kg	pH	Organic Carbon (C) g/kg	Total N g/kg	C/N	CEC cmol+/Kg
<b><i>Ve-low</i></b>	44 ± 14 [a]	24 ± 13 [a]	33 ± 27 [a]	242 ± 83 [a]	657 ± 133 [a]	4.8 ± 0.8 [a]	26.4 ± 6.9 [a]	1.47 ± 0.25 [a]	17.9 ± 1.6 [ab]	2.5 ± 1.4 [a]
<b><i>Ve-med</i></b>	84 ± 4 [b]	36 ± 3 [a]	16 ± 8 [a]	148 ± 87 [a]	716 ± 90 [a]	5.1 ± 0.5 [a]	23.3 ± 4.1 [a]	1.49 ± 0.32 [a]	15.7 ± 0.7 [a]	3.9 ± 1.0 [a]
<b><i>Ve-high</i></b>	77 ± 7 [ab]	37 ± 10 [a]	37 ± 12 [a]	172 ± 111 [a]	678 ± 92 [a]	5.6 ± 0.3 [a]	39.2 ± 10.8 [a]	1.71 ± 0.47 [a]	23.0 ± 2.3 [b]	3.7 ± 1.3 [a]
<b><i>Be-low</i></b>	151 ± 14 [a]	153 ± 14 [a]	63 ± 3 [a]	121 ± 4 [a]	511 ± 26 [a]	6.2 ± 0.2 [b]	27.0 ± 7.3 [a]	1.68 ± 0.50 [a]	16.2 ± 0.4 [b]	8.5 ± 3.0 [a]
<b><i>Be-med</i></b>	125 ± 17 [a]	110 ± 11 [a]	65 ± 17 [a]	131 ± 18 [a]	570 ± 62 [a]	5.7 ± 0.1 [ab]	19.8 ± 1.5 [a]	1.43 ± 0.13 [a]	13.9 ± 0.7 [ab]	8.1 ± 1.4 [a]
<b><i>Be-high</i></b>	163 ± 21 [a]	129 ± 11 [a]	82 ± 4 [a]	156 ± 12 [a]	471 ± 42 [a]	5.2 ± 0.1 [a]	21.2 ± 1.8 [a]	1.65 ± 0.13 [a]	12.8 ± 0.1 [a]	4.5 ± 0.7 [a]
<b><i>La-low</i></b>	336 ± 15 [ab]	160 ± 5 [a]	129 ± 12 [a]	314 ± 30 [a]	61 ± 8 [a]	5.4 ± 0.3 [a]	82.4 ± 9.5 [a]	7.69 ± 1.16 [a]	10.8 ± 0.5 [a]	17.0 ± 3.4 [a]
<b><i>La-med</i></b>	381 ± 36 [b]	208 ± 32 [a]	124 ± 15 [a]	219 ± 41 [a]	68 ± 6 [a]	5.3 ± 0.2 [a]	61.8 ± 1.8 [a]	6.46 ± 0.10 [a]	9.5 ± 0.1 [a]	21.3 ± 5.3 [a]
<b><i>La-high</i></b>	308 ± 9 [a]	211 ± 7 [a]	161 ± 8 [a]	241 ± 9 [a]	79 ± 10 [a]	5.4 ± 0.1 [a]	60.4 ± 7.5 [a]	5.16 ± 0.21 [a]	11.7 ± 1.6 [a]	17.7 ± 0.8 [a]

**a.** Values are means (n=3) ± standard errors.

**b.** For ID sample, the samples from Veluwe LTO are represented by ***Ve-low*** (long term abandoned grassland: 26-29 years), ***Ve-med*** (medium term abandoned grassland: 16-23 years) and ***Ve-high*** (short term abandoned grassland: 6-9 years). The samples from Berchida LTO are represented by ***Be-low*** (Woodland), ***Be-med*** (Wooded pasture grazed and periodically (5-10 years) cultivated to grow annual forage crops) and ***Be-high*** (Intensive grassland grazed and periodically (1-5 years) cultivated to grow annual forage crops). The samples from Lancaster LTO are represented by ***La-low*** (natural grassland grazed), ***La-med*** (natural grassland grazed and fertilized) and ***La-high*** (cultivated grassland (tillage + seeding), grazed and fertilized). For each parameter, the values with different letters differ significantly (P<0.05).

### 3- Results

#### 3.1- Soil physicochemical characteristics

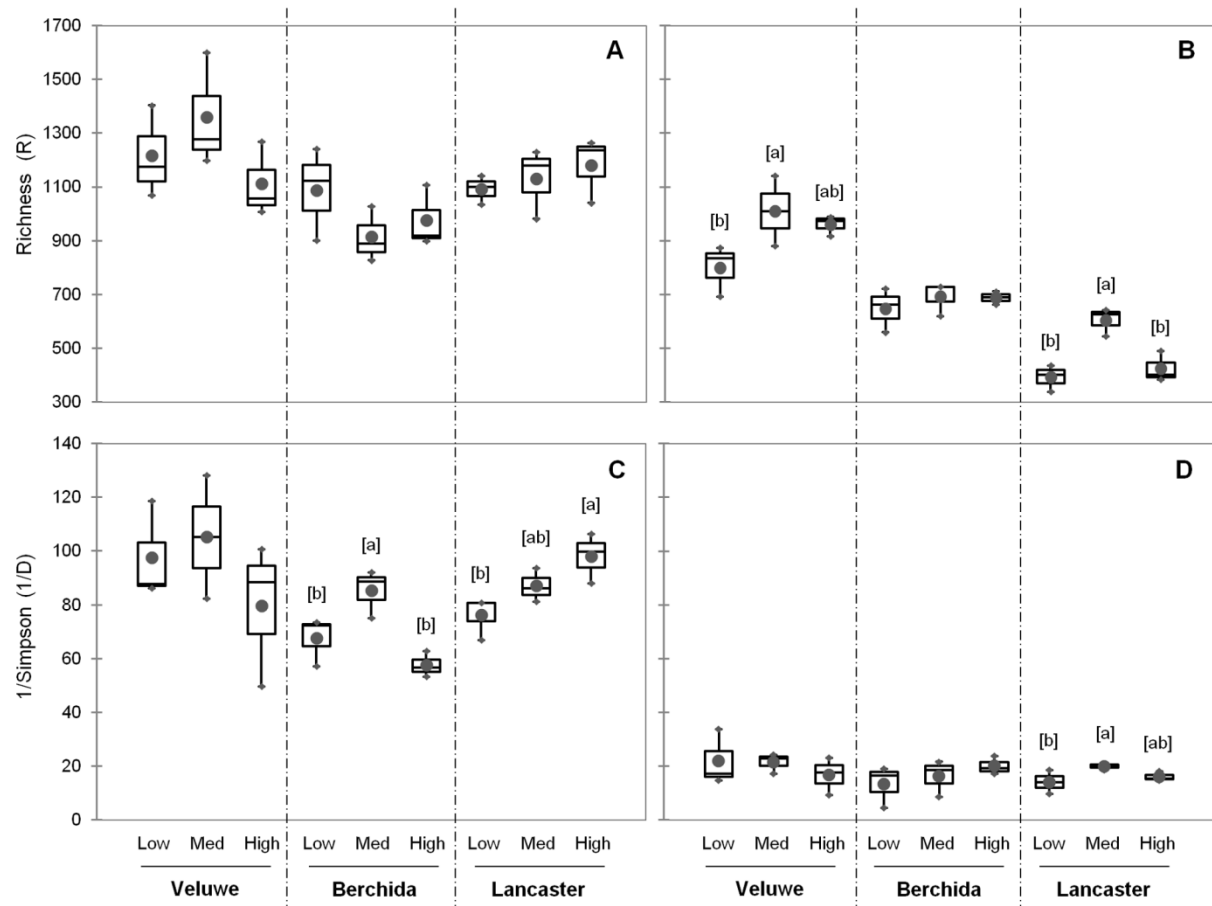
Soil texture varied greatly between the three LTOs, with Veluwe, Berchida and Lancaster corresponding to loamy sand, sandy loam and clay loam soils, respectively (Table III-1). However, whatever the LTO, the texture did not differ significantly according to land use intensity. When each LTO was examined independently, land use intensification was found to significantly modify soil chemical properties (Table III-1). A decrease of pH and C/N ratio occurred along the gradient of intensification at Berchida, whereas a decrease of C/N ratio was observed for Ve-med at Veluwe.

#### 3.2- Diversity and composition of bacterial and fungal communities

Pyrosequencing yielded a total of 527,017 and 659,091 sequences of 16S and 18S rDNA with an average of 19,519 and 24,410 sequences per sample, respectively. The rarefaction curves of bacterial OTU confirmed that our sequencing effort allowed an accurate description of the bacterial diversity in each soil sample (*data not shown*).

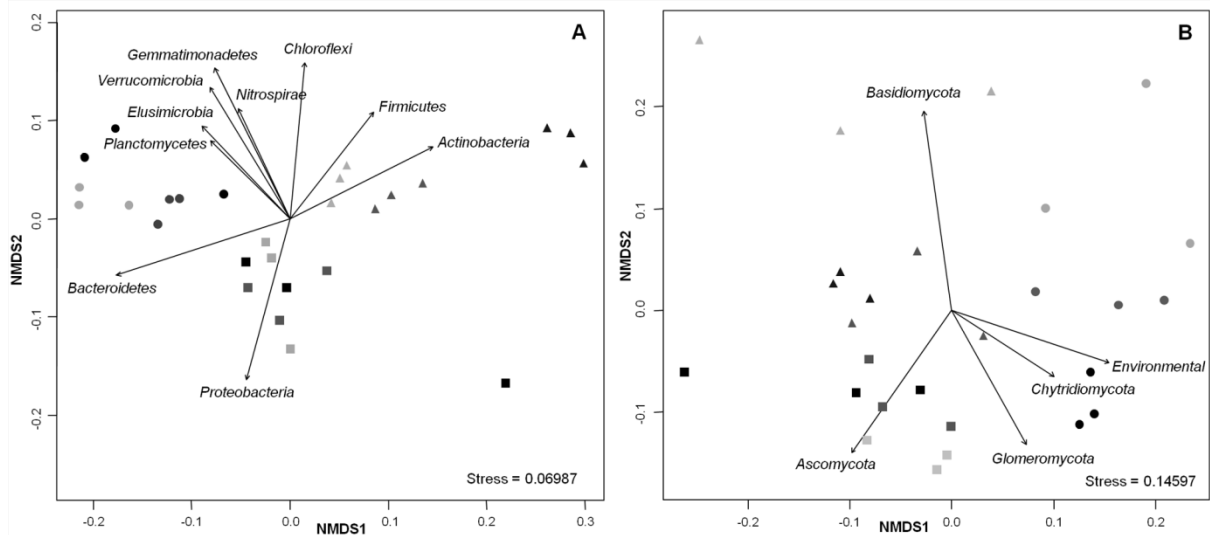
Calculation of the diversity indexes evidenced greater variation in bacterial and fungal diversity between the three LTOs than between the three intensification levels at each LTO (Figure III-3). Regardless of the level of land use intensity, the gradient observed for bacterial diversity : Veluwe ( $R=1228 \pm 187$ ;  $1/D=94.1 \pm 22.8$ ) > Lancaster ( $R=1134 \pm 101$ ;  $1/D=87.1 \pm 11.7$ ) > Berchida ( $R=992 \pm 138$ ;  $1/D=70.1 \pm 13.9$ ) differed from the gradient observed for fungi: Veluwe ( $R=923 \pm 126$ ;  $1/D=20 \pm 7$ ) > Berchida ( $R=675 \pm 57$ ;  $1/D=16.5 \pm 6.2$ ) > Lancaster ( $R=473 \pm 109$ ;  $1/D=16.7 \pm 3.5$ ) (Supplementary Figure III-S1).

Land use intensity also caused significant changes in the microbial diversity indexes within each LTO (Figure III-3). At Veluwe, similar trends were observed for both bacterial and fungal communities, characterized by increased diversity indexes in *Ve-med* (bacterial  $R=1359 \pm 213$ ;  $1/D=105.2 \pm 22.9$ ; fungal  $R=1011 \pm 130$ ) compared to *Ve-high* and *Ve-low*. At Lancaster, similar higher diversity indexes were observed for fungi in *La-med*, but not for bacteria which increased regularly along the low/medium/high gradient. At Berchida, fungal diversity did not vary significantly between the three intensity levels whereas bacterial diversity was increased in *Be-med*.



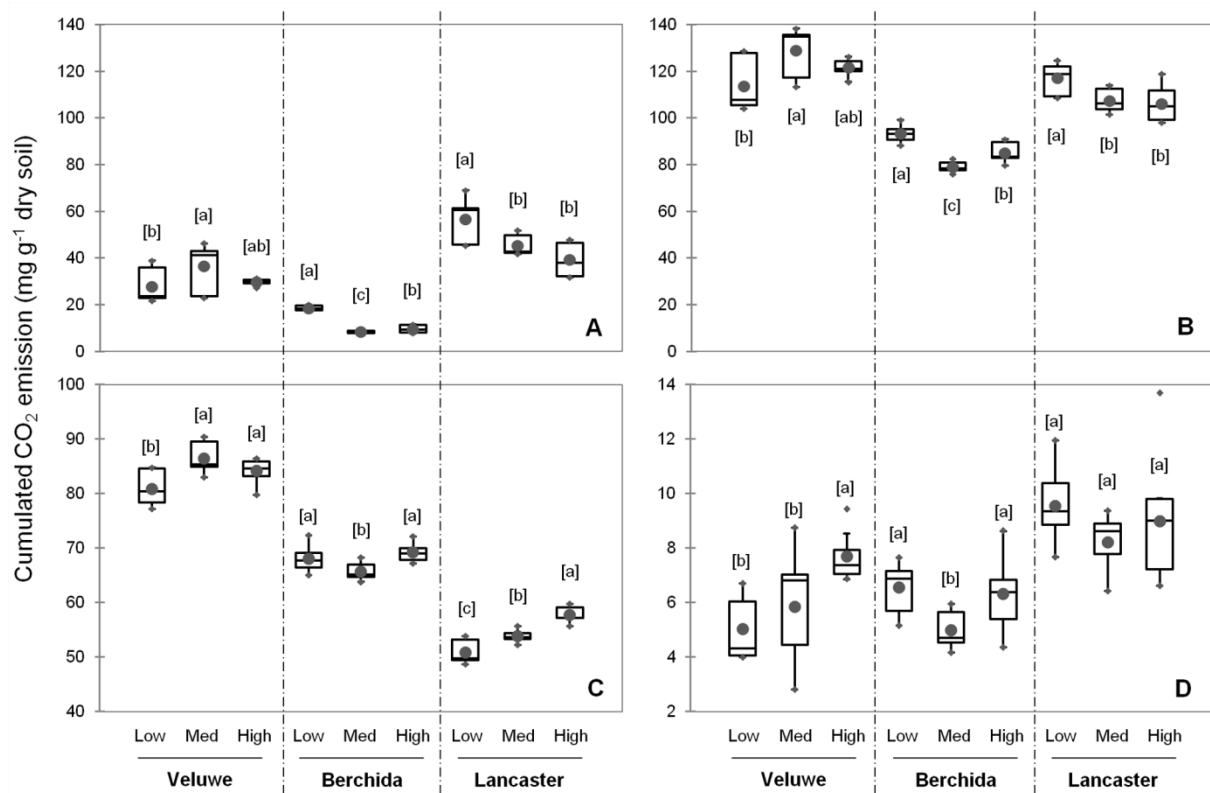
**Figure III-3:** Variation of diversity indexes represented by bacterial (A) and fungal (B) richness (R) and 1/Simpson indexes (1/D) for bacterial (C) and fungal communities (D) for each level of land use management (low, medium and high) for the three LTOs (Veluwe, Berchida and Lancaster). The richness index represents the number of OTU defined at the genus level and, for the 1/Simpson index, the high number indicates greater diversity. In the whisker box representation, the first (Q1), median, and third (Q3) quartiles are indicated by the bottom, the central, and the top line of the box respectively. The bottom whisker extends to the lowest value of the data set, while the top whisker extends to the highest one. Letters in brackets indicate significant differences between land use for each LTO, according to the Fisher test ( $P < 0.05$ ).

NMDS analysis of the full bacterial- and fungal-sequences datasets enabled the structures of the bacterial and fungal communities to be discriminated according to the LTO and to land use intensity (Figure III-4). As observed for the diversity indexes, the main parameter discriminating both bacterial and fungal communities was the “LTO effect”, with distinct structures observed between the three LTOs (confirmed by Pairwise ANOSIM test ( $R = 0.721$ ,  $P = 0.001$  for bacteria; and  $R = 0.569$ ,  $P = 0.001$  for fungi). The same dominant bacterial and fungal phyla were detected in all three LTOs, but the distribution of these groups in terms of relative abundance varied according to the LTO. Thus, *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Basidiomycota* were more frequent at the Berchida LTO; *Proteobacteria*, *Ascomycota*, and *Glomeromycota* were more abundant at the Veluwe LTO; and *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Glomeromycota* and *Chytridiomycota* were more abundant at the Lancaster LTO (Figure III-4).



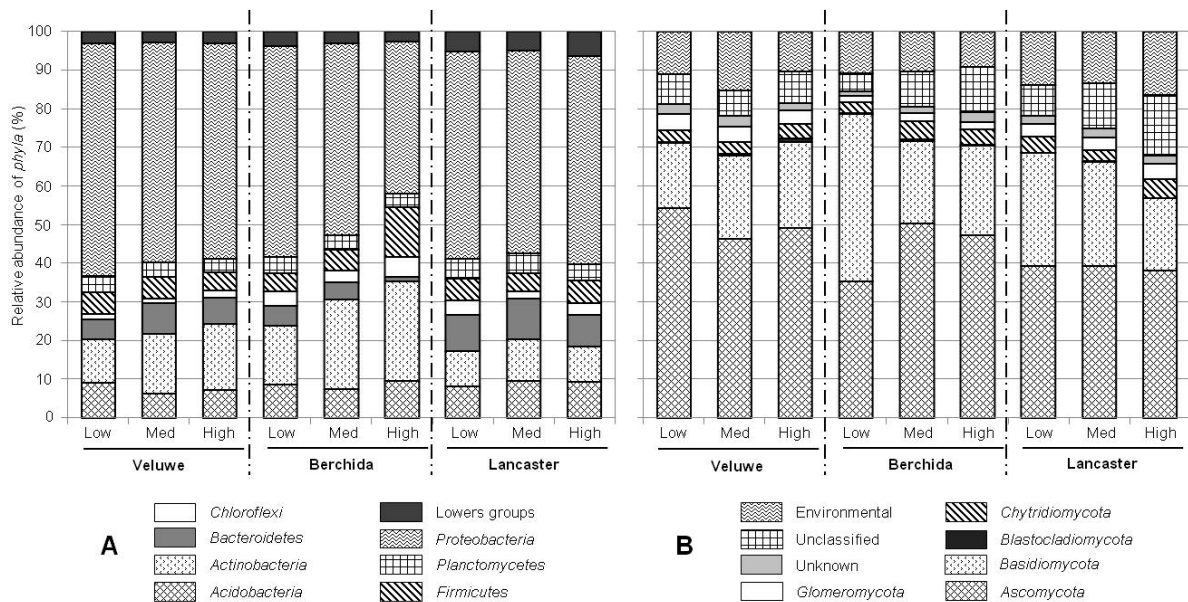
**Figure III-4:** Non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) ordination plot derived from weighted pairwise UniFrac distances of (A) bacterial and (B) fungal communities for the LTO of Veluwe (□), Berchida (△) and Lancaster (○) with each level of intensification corresponding to low (light grey), medium (dark grey) and high (black). The stress values for all plots were  $< 0.2$  which indicates that these data were well-represented by the two dimensional representation. Vectors in the bi-plot overlay were constructed from a matrix containing the relative abundances of each microbial *phylum*. Only correlations  $\leq 0.05$  were included. The angle and length of the vector indicate the direction and strength of the variable.

Land use intensity also significantly impacted the structure of bacterial and fungal communities, with significant discrimination between low, medium and high treatments taking each LTO independently ( $R = 0.77$ ,  $P = 0.001$  for bacteria; and  $R = 0.678$ ,  $P = 0.001$



**Figure III-6:** Variation of areas (mg g<sup>-1</sup> dry soil) under the cumulated CO<sub>2</sub> emission of different C-cycling activities measured according to land use management (low, medium and high) for the three LTOs (Veluwe, Berchida and Lancaster) with (A) basal mineralization (R<sub>s</sub> control soil), (B) total mineralization (R<sub>t</sub>), (C) wheat residues mineralization and (D) Priming Effect. In the whisker box representation, the first (Q1), median, and third (Q3) quartiles are indicated by the bottom, the central, and the top line of the box, respectively. The bottom whisker extends to the lowest value of the data set, while the top whisker extends to the highest one. Letters in brackets indicate significant differences between land use for each LTO, according to the Fisher test (P < 0.05).

for fungi) (Figure III-4). The bacterial and fungal phyla explaining the discrimination were identified by analysing the taxonomic compositions at the three intensification levels for each LTO (Figure III-5; Supplementary Table III-S1). At Veluwe, discrimination was mainly explained by an increase in the relative abundance of *Actinobacteria* (from  $11.2 \pm 1.3$  to  $17.2 \pm 2.7$  %) and a decrease of *Planctomycetes* (from  $4.2 \pm 0.1$  to  $3.4 \pm 0.5$  %) and *Proteobacteria* along the low/medium/high gradient. At Berchida, the relative importance of *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Nitrospirae* and *Ascomycota* increased significantly with land management intensity, whereas that of *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* and *Basidiomycota* decreased. At Lancaster, the medium intensity was characterized by an increased relative abundance of *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* groups.



**Figure III-5:** Relative abundance of both (A) bacterial and (B) fungal phyla in microbial composition according to LTO (Veluwe, Berchida and Lancaster) and level of intensification of land use management (low, med (medium) and high). Lower groups represent the phylogenetic groups (phyla) with a relative abundance < 1%.

### 3.3- Impact of land use management on carbon mineralization

Each of the four activities measured, expressed as the areas under the cumulated CO<sub>2</sub> emission, showed greater variance between the LTOs than between the three levels of land use intensity in each LTO (Figure III-6). Regardless of land use, ordination of the LTOs based on the intensity of CO<sub>2</sub> emission was dependent on the activity considered (Supplementary Figure III-2). Basal soil mineralization was significantly higher at Lancaster ( $47.1 \pm 9.8$  mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil) than at Veluwe ( $31.3 \pm 7.9$  mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil) and Berchida ( $12.1 \pm 4.8$

**Table 2:** Partitioning of the functional variation of different C-cycling activities measured as a function of biotic and abiotic parameters.

	df <sup>a</sup>	Sum of square	F <sup>b</sup>	Significance <sup>c</sup>	Variance explained (%)	Relation <sup>d</sup>
<b>Basal mineralization (R<sub>s</sub> control soil)</b>						
Bacterial richness	1	0.6955	39.511	***	32.23	+
Fungal richness	1	0.3820	21.703	***	17.71	-
Fungal 1/Simpson	1	0.0006	0.034	ns	0.03	
Fine sand	1	0.3042	17.279	***	14.10	+
SOC	1	0.4057	23.048	***	18.80	+
Residuals	21	0.3697				
<b>Total Mineralization (R<sub>t</sub>)</b>						
Bacterial richness	1	0.0583	28.493	***	41.92	+
Fungal richness	1	0.0000	0.015	ns	0.02	
Fungal 1/Simpson	1	0.0013	0.624	ns	0.92	
Fine sand	1	0.0196	9.558	**	14.06	+
SOC	1	0.0170	8.284	**	12.19	+
Residuals	21	0.0430				
<b>Wheat residues mineralization (R<sub>r</sub>)</b>						
Fungal richness	1	0.1334	187.618	***	76.99	+
Bacterial 1/Simpson	1	0.0011	1.617	ns	0.66	
Fungal 1/Simpson	1	0.0048	6.714	*	2.76	+
pH	1	0.0012	1.652	ns	0.68	
Soil C/N ratio	1	0.0156	21.912	***	8.99	+
SOC	1	0.0030	4.184	°	1.72	-
Residuals	20	0.0142				
<b>Priming Effect (PE)</b>						
Fungal 1/Simpson	1	0.0219	3.532	°	5.83	-
Fine sand	1	0.1874	30.270	***	49.97	+
Soil C/N ratio	1	0.0234	3.772	°	6.23	-
Residuals	23	0.1424				

<sup>a</sup> degrees of freedom

<sup>b</sup> Fisher test

<sup>c</sup> significance was determined by 1000 permutations with \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ ;  $P < 0.1$  and ns (not significant),  $P \geq 0.1$ .

<sup>d</sup> relationship was determined from the linear regression between area and significant variable, with a positive relationship (+) when the area of respiration increased with an increase of the variable, and a negative relationship (-) when the area of respiration decreased with an increase of the variable.

mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil). Measurements of total mineralization in soil microcosms amended with wheat residues revealed the gradient: Veluwe (121.4 ± 10.7 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil) > Lancaster (110.2 ± 7.9 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil) > Berchida (85.8 ± 6.7 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil). The intensity of wheat residues mineralization also varied significantly between the three LTOs, with Veluwe (83.8 ± 3.5 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil) > Berchida (67.6 ± 2.4 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil) > Lancaster (54.1 ± 3.2 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil). Wheat addition induced a PE in all three LTOs, which was higher at Lancaster (8.9 ± 1.6 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil) than at Veluwe and Berchida, which were similar (6.2 ± 1.8 and 5.9 ± 1.2 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil, respectively).

Impact of land use intensity was dependent on the LTO and the C-cycling activities (Figure III-6). At Veluwe, significantly higher values for basal respiration, total and wheat residues mineralization were observed in *Ve-med* than in *Ve-low*, with intermediate values in *Ve-high*. In contrast, the intensity of the priming effect increased with increasing land use intensity, ranging from 5.0 ± 1.0 to 7.7 ± 0.8 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil. At Berchida, the four C-cycling activities measured were always significantly lower in *Be-med* than in *Be-low* and *Be-High*. Similar values for wheat residue mineralization and PE were observed in *Be-med* and *Be-High* whereas the highest values for basal- and total mineralization were recorded in *Be-low*. At Lancaster, both basal- and total mineralization decreased with increasing land use intensity. On the contrary, wheat residues mineralization increased with increasing land use intensity, ranging from 50.8 ± 1.9 to 57.7 ± 1.3 mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> dry soil. PE intensity did not differ between the three land use intensities.

### 3.4- Ranking the influence of biotic and abiotic variables on C-cycling activities

Eight out of 20 variables, selected on the basis of their low cross-correlation (Supplementary Figure III-S3), were included in the multiple regression models. These 8 variables represented abiotic (physicochemical properties of soil: pH, soil C/N ratio, SOC and fine sand) and biological variables (richness and the 1/D index for both fungal and bacterial communities). The multiple regression model with selected variables was able to explain very large proportions of the variance in intensity for each of the four C-cycling activities, ranging from 62 for PE to 89 % for wheat residues mineralization (Table III-2).

Biological variables were the strongest predictors for three of the measured activities, explaining 42, 50, and 80 % of the observed variance for total-, basal-, and wheat residues-mineralization, respectively. In contrast, PE was better predicted by abiotic (56 %) than by





biotic variables (6 %). All variables were always positively correlated with the measured activities, excepted fungal richness which was negatively correlated with basal respiration. The identity and/or rank of the most predictive variables varied according to the activity. More precisely, bacterial richness was the best predictor of basal- and total-mineralization. However, fungal richness explained 17.7 % of basal respiration (negatively correlated) but was not a significant driver of total-mineralization. Among the abiotic variables, fine sand and soil organic carbon contents were both good predictors of basal and total mineralization. In contrast to the two above-mentioned activities, bacterial diversity was not a significant driver of wheat residue mineralization and PE, which were instead driven by fungal diversity. Thus, fungal richness accounted very strongly (77 %) for wheat residue mineralization, and fungal diversity explained a small but significant part of the variance in PE (5.8%). Soil C/N ratio, an indicator of organic matter maturity but not soil organic carbon content was also a predictor of wheat residue mineralization and PE. A very significant proportion of the variance in PE was explained by fine sand soil content.



## 4- Discussion

Microbial diversity and composition differed more between the three LTOs than between the three treatments within each LTO. The strong variation in soil physicochemical characteristics between the three LTOs is likely to have largely accounted for the discrimination of microbial communities in terms of richness and composition (Fierer & Jackson 2006; Dequiedt *et al.*, 2011; de Vries *et al.*, 2012; Kuramae *et al.*, 2012). Physical and chemical properties indeed determine soil aggregation and porosity as well as soil trophic status, and consequently the number and diversity of microbial habitats in terms of size (macro- vs. micro-aggregates), quality (trophic status, pH...), and connectivity. Microbial composition provided indications about the environmental filters that may have driven the microbial diversity in each LTO. For instance, the greater abundance of *Actinobacteria* and *Firmicutes* at Berchida suggests that the microbial diversity signature may have been influenced by the Mediterranean climate at this location. Indeed, both groups share the ability to produce endospores, which has been shown to increase their ability to survive stressful climatic conditions, such as warming and desiccation, over other phyla (Hayden *et al.*, 2012; Sharmin *et al.*, 2013). In addition, plant cover and more particularly the presence of oaks in this LTO, might also explain the greater overall contribution of *Basidiomycota* to the fungal composition at this location. This fungal group is indeed widely represented in forest soils since it possesses improved metabolic capacities for decomposing lignocellulose, a major component of organic C in tree-wood debris (de Boer *et al.*, 2005; Baldrian 2008; Voříšková & Baldrian 2013). The Veluwe and Lancaster LTOs were dominated by *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*, two groups described as fast growing copiotrophs stimulated by C-rich environments (Fierer *et al.*, 2007; Pascual *et al.*, 2013), which is in agreement with the higher overall C content measured at these two sites than at Berchida. Altogether, our results highlight the fact that soils, because they depend on pedoclimatic characteristics, do not naturally have the same potential capacities to host microbial genetic resources. This is an important point since it suggests that the type and/or location of the soil may limit the possible range of improvements of soil microbial diversity that may be achieved through land use.

Land use intensity had a significant impact on the diversity and composition of bacterial and fungal communities in each LTO. This shows that even though the soil's ability to host microbial diversity may be highly constrained by pedoclimatic properties, land use may serve as a proximal “control lever” to modify microbial diversity. This is in agreement with other studies conducted at the field scale (Acosta-Martínez *et al.*, 2008; Lienhard *et al.*,



2013) or regional scale (Drenovsky *et al.*, 2010). However, our study of three LTOs representing gradients of land use intensity made it possible to link cropping intensity with microbial diversity in contrasting pedoclimatic contexts. Interestingly, no simple decrease in soil microbial diversity (*i.e.* richness and 1/D) with increasing land use intensity was observed, whatever the LTO. Instead, the general trend observed for both bacterial and fungal communities, in all three LTOs, was an increase in diversity (*i.e.* richness and 1/D) under medium land use intensity, as compared to low- and high-intensities. This finding emphasizes that the hump-back model, describing the response of a community to stress (Giller *et al.*, 1998), can also be applied to the microbial response to perturbations associated with land use intensity. This is of major importance since it suggests that human activities in agrosystems may not necessarily have a negative, linear impact on soil microbial diversity, but may instead enable an optimum (*i.e.* climax of soil microbial genetic resources) to be attained, which may also have a positive impact on soil functioning. Interestingly, this optimum was reached for both bacteria and fungi in the medium intensity treatment at Berchida and Veluwe. At Lancaster, the same pattern was observed for fungi but not for bacteria, the bacterial diversity showing a linear increase with the gradient of land use intensity. This discrepancy may be ascribed to the fact that tillage was only applied in the high-intensity plots. Soil mechanical disturbance, particularly tillage, has recently been demonstrated to increase bacterial diversity and reduce fungal diversity (Lienhard *et al.*, 2013), probably due to the greater sensitivity of the fungal hyphal network to physical disruption (Helgason *et al.*, 1998; van der Wal *et al.*, 2006).

Similarly to the biotic and abiotic soil parameters, the C-cycling activities patterns differed between the LTOs but also along the gradient of intensification within each LTO (Figure 4). Partitioning of the functional variation, using the set of biotic and abiotic soils parameters, revealed that 62 to 89 % of the variance in intensity of C-cycling activities could be explained (Table 1). Among the parameters selected in our model, a significant proportion of this variance was explained by soil organic status (*i.e.* SOC, soil C/N). This positive effect of soil organic matter quantity and quality on the intensity of CO<sub>2</sub> fluxes is well established (Henriksen & Breland, 1999; Nicolardot *et al.*, 2001). Indeed, the degradability and the amount of C-resources are known to be two key factors controlling soil microbial biomass and activity (supported by our results showing a correlation between molecular biomass and SOC, Supplementary Figure 3). As such, these are the parameters included in most of the current models of C-dynamics in soil (Fang *et al.*, 2005). However, our results also showed



that microbial diversity parameters were the best predictors of all the activities measured (except PE). This finding is of major importance since it highlights the significant role of microbial diversity in determining C-dynamics in soil, which may be at least as important as microbial biomass and soil chemical and physical properties. These results also confirm the recently demonstrated decrease in soil ability to carry out C-transformations consecutive to the experimental erosion of microbial diversity (Bell *et al.*, 2005; Baumann *et al.*, 2012; Tardy *et al.*, 2013). Focusing on the effect of each biological variable, microbial richness was shown to be the best predictor of all the activities measured, except PE. Interestingly, the relative importance of bacterial vs. fungal diversity varied between the activities measured, suggesting that the relative involvement of these two microbial groups is dependent on the quality of the C-sources (de Boer *et al.*, 2005). Bacterial, and to a lesser extent fungal, richness were good predictors of soil basal respiration intensity (explaining 32.23 and 17.71 % of the variance, respectively). However, the relationship between microbial diversity and basal respiration was positive for bacteria and negative for fungi, suggesting a major role of bacteria. This result may be related to our particular soil selection, which essentially included agricultural and grassland soils. Indeed, soil fungal biomass has been demonstrated to be more affected by soil management practices and grassland intensification than bacterial biomass (Bardgett & Leemans, 1996; Bardgett & McAlister, 1999; Frey *et al.*, 1999), hence reducing the relative involvement of fungi in ecosystem processes under intensively managed agricultural land (van der Wal *et al.*, 2006). This major involvement of bacteria was also observed for total mineralization, measured after wheat residue incorporation, with bacterial richness alone explaining 41.92 % of the variance of this activity whereas the fungal diversity parameters were not significant explanatory variables. In contrast, fungal richness, but not bacterial diversity explained an impressive proportion of the intensity of wheat mineralization (76.99%). This is in agreement with the general assumption that fungi are the primary decomposers of dead plant biomass in terrestrial ecosystems (Voříšková & Baldrian, 2013). In other respects, the strength of the relationship between fungal richness and residue decomposition was likely to be further enhanced by the high recalcitrance to decomposition of the wheat straw residues used, (C/N ratio of 77.67). Fungi, through their ability to produce a wide range of extracellular enzymes and to perforate plant cell walls, are assumed to be better decomposers of recalcitrant organic matter than bacteria (de Boer *et al.*, 2005). Addition of wheat straw residues to the soil induced a PE in all LTOs, whatever the land use intensity, highlighting the widespread occurrence of this process in soil. PE was the only one of the four C-activities, for which the variance was more explained by soil physical properties (soil fine





sand content and C/N ratio, together accounting for 56.2 % of the variance) than by the microbial diversity parameters taken into account in our variance partitioning model. This was not in agreement with recent studies showing that PE may depend on interactions between different guilds of bacteria (Pascault *et al.*, 2013) and fungi (Fontaine *et al.*, 2011), and consequently on microbial diversity. However, this discrepancy may be due to the fact that these particular processes may depend more on the composition (*i.e.* presence of particular microbial populations/groups, referred to as r-, and k- strategists (Pascault *et al.*, 2013)) than on the quantitative estimates of diversity taken into account in our model.

In conclusion, by using three gradients of land use intensity at three different European LTOs, we were able to demonstrate that the hump-back model describing the response of a community to stress may also be applicable to the microbial response to perturbations associated with land use intensity. This result has important implications since it suggests that it may be possible to improve soil genetic resources by applying appropriate land management practices. Another important output of this study is that, for the first time, it has been possible to rank the soil chemical, physical and microbiological diversity properties contributing to C-transformations in soil. Thus, our results indicate that microbial diversity may be at least as good a predictor of the transformations involved in the C-cycling in soil, as soil chemistry or structure, explaining up to 80% of the variance in intensity of the activities measured. Altogether, our study provides considerable evidence that managing soil microbial diversity through appropriate land use may provide a promising means of improving C-cycling and related ecosystem services in soil.

## **Acknowledgements**

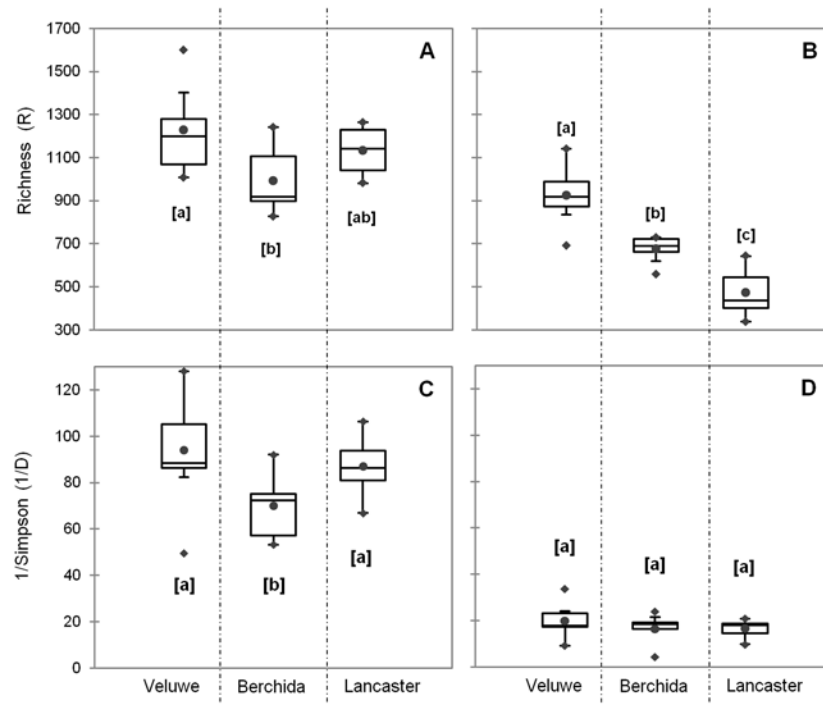
This work was supported by a grant from the Regional Council of Burgundy, and by the European Commission within the EcoFINDERS project (FP7-264465). This work benefitted from the technical facilities of the Genosol platform of the infrastructure ANAEE-France [ANALysis and Experimentations on Ecosystems, ANR programme ‘Investments for the Future’ (reference ANR-11-INBS-0001)].

**Supplementary Table 1:** Relative abundance (%) of bacterial and fungal phyla in microbial composition according to LTO and land use intensification.

	Lancaster			Veluwe			Berchida		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
<b>Phyla 16S</b>									
<i>Acidobacteria</i>	8.1 ± 0.3 [b]	9.4 ± 0.5 [a]	9.2 ± 0.7 [a]	9.0 ± 1.0 [a]	6.2 ± 3.6 [a]	7.1 ± 1.1 [a]	8.50 ± 2.7 [a]	7.3 ± 2.0 [a]	9.6 ± 1.3 [a]
<i>Actinobacteria</i>	9.1 ± 1.0 [a]	10.8 ± 1.3 [a]	9.3 ± 1.5 [a]	11.2 ± 1.3 [b]	15.5 ± 2.4 [ab]	17.2 ± 2.7 [a]	15.4 ± 3.5 [b]	23.4 ± 2.4 [a]	25.8 ± 4.5 [a]
<i>Bacteroidetes</i>	9.4 ± 1.7 [ab]	10.7 ± 0.5 [a]	8.1 ± 1.4 [b]	5.2 ± 2.8 [a]	7.9 ± 0.5 [a]	6.9 ± 0.8 [a]	5.0 ± 0.5 [a]	4.3 ± 0.9 [a]	1.2 ± 0.4 [b]
<i>Chloroflexi</i>	3.7 ± 1.4 [a]	1.7 ± 0.1 [a]	3.2 ± 1.7 [a]	1.4 ± 1.2 [a]	1.2 ± 0.4 [a]	1.8 ± 0.6 [a]	3.7 ± 1.2 [a]	3.1 ± 0.9 [a]	5.0 ± 1.2 [a]
<i>Firmicutes</i>	5.7 ± 1.4 [a]	4.8 ± 0.4 [a]	5.7 ± 1.7 [a]	5.7 ± 0.9 [a]	5.6 ± 2.1 [a]	4.8 ± 1.0 [a]	4.9 ± 0.5 [b]	5.5 ± 1.6 [b]	13.0 ± 1.2 [a]
<i>Planctomycetes</i>	5.0 ± 1.1 [a]	5.1 ± 0.9 [a]	4.3 ± 1.3 [a]	4.2 ± 0.1 [a]	3.9 ± 0.2 [ab]	3.4 ± 0.5 [b]	4.1 ± 0.1 [a]	3.7 ± 1.0 [a]	3.6 ± 0.7 [a]
<i>Proteobacteria</i>	53.6 ± 3.7 [a]	52.4 ± 2.1 [a]	53.9 ± 4.7 [a]	60.2 ± 3.7 [a]	56.8 ± 1.0 [a]	55.8 ± 3.1 [a]	54.6 ± 0.6 [a]	49.7 ± 4.4 [b]	39.4 ± 2.9 [c]
Lower groups <sup>a</sup>	5.3 ± 0.7 [a]	5.0 ± 0.3 [a]	6.3 ± 1.5 [a]	3.1 ± 1.0 [a]	2.9 ± 0.6 [a]	3.1 ± 1.0 [a]	3.8 ± 0.6 [a]	3.0 ± 0.5 [b]	2.5 ± 0.4 [b]
<i>Elusimicrobia</i>	0.3 ± 0.0 [b]	0.4 ± 0.0 [a]	0.4 ± 0.1 [a]	0.3 ± 0.2 [a]	0.2 ± 0.1 [a]	0.1 ± 0.0 [a]	0.2 ± 0.1 [a]	0.2 ± 0.1 [a]	0.1 ± 0.1 [a]
<i>Verruimicrobia</i>	1.2 ± 0.2 [a]	1.2 ± 0.5 [a]	1.5 ± 0.8 [a]	0.4 ± 0.3 [a]	0.5 ± 0.1 [a]	0.5 ± 0.2 [a]	1.3 ± 0.3 [a]	0.6 ± 0.1 [b]	0.3 ± 0.1 [b]
<i>Nitrospirae</i>	0.8 ± 0.2 [a]	0.9 ± 0.2 [a]	1.3 ± 0.5 [a]	0.5 ± 0.3 [a]	0.4 ± 0.2 [a]	0.4 ± 0.1 [a]	0.2 ± 0.1 [b]	0.3 ± 0.1 [b]	0.8 ± 0.2 [a]
<i>Gemmatimonadetes</i>	1.1 ± 0.2 [a]	1.1 ± 0.3 [a]	1.5 ± 0.3 [a]	0.5 ± 0.5 [a]	0.6 ± 0.3 [a]	0.7 ± 0.3 [a]	0.9 ± 0.2 [a]	0.8 ± 0.1 [a]	0.6 ± 0.2 [a]
<b>Phyla 18S</b>									
<i>Ascomycota</i>	39.2 ± 5.4 [a]	39.1 ± 2.8 [a]	38.0 ± 5.1 [a]	54.1 ± 7.1 [a]	46.0 ± 3.9 [a]	49.0 ± 7.1 [a]	35.3 ± 5.9 [a]	50.2 ± 10.6 [a]	47.1 ± 4.6 [a]
<i>Basidiomycota</i>	29.2 ± 11.0 [a]	26.9 ± 2.5 [a]	18.8 ± 2.6 [a]	16.8 ± 1.3 [a]	21.7 ± 0.9 [a]	22.2 ± 6.4 [a]	43.3 ± 12.8 [a]	21.3 ± 4.4 [b]	23.2 ± 4.3 [b]
<i>Blastocladiomycota</i>	0.2 ± 0.2 [a]	0.2 ± 0.2 [a]	0.1 ± 0.1 [a]	0.4 ± 0.4 [a]	0.2 ± 0.1 [a]	1.0 ± 1.0 [a]	0.2 ± 0.1 [a]	0.5 ± 0.3 [a]	0.3 ± 0.3 [a]
<i>Chytridiomycota</i>	4.0 ± 2.4 [a]	2.8 ± 0.6 [a]	4.9 ± 0.4 [a]	3.1 ± 1.1 [a]	3.2 ± 0.2 [a]	3.8 ± 1.4 [a]	2.8 ± 1.3 [a]	4.6 ± 1.2 [a]	3.9 ± 0.9 [a]
<i>Cryptomycota</i>	0.1 ± 0.1 [a]	0.2 ± 0.1 [a]	0.1 ± 0.1 [a]	0.2 ± 0.2 [a]	0.3 ± 0.1 [a]	0.1 ± 0.0 [a]	0.1 ± 0.1 [a]	0.3 ± 0.2 [a]	0.1 ± 0.0 [a]
<i>Glomeromycota</i>	3.4 ± 0.9 [a]	3.3 ± 0.8 [a]	4.0 ± 0.1 [a]	4.1 ± 1.2 [a]	3.8 ± 0.8 [a]	3.5 ± 1.1 [a]	1.6 ± 0.5 [a]	2.1 ± 0.1 [a]	2.0 ± 0.5 [a]
<i>Neocallimastigomycota</i>	0.0 ± 0.0 [a]	0.0 ± 0.1 [a]	0.0 ± 0.0 [a]	0.0 ± 0.0 [a]	0.1 ± 0.1 [a]	0.1 ± 0.1 [a]	0.0 ± 0.0 [a]	0.0 ± 0.0 [a]	0.0 ± 0.0 [a]
Unknown	2.1 ± 0.5 [a]	2.5 ± 0.5 [a]	2.1 ± 0.3 [a]	2.4 ± 0.4 [ab]	2.9 ± 0.4 [a]	1.9 ± 0.4 [b]	1.3 ± 0.8 [b]	1.5 ± 0.2 [ab]	2.5 ± 0.2 [a]
Unclassified	8.1 ± 3.3 [b]	11.6 ± 2.0 [ab]	15.6 ± 1.3 [a]	7.7 ± 1.9 [a]	6.4 ± 2.6 [a]	8.0 ± 1.3 [a]	4.6 ± 1.3 [a]	9.1 ± 6.9 [a]	11.7 ± 5.0 [a]
Environmental	13.7 ± 3.0 [a]	13.4 ± 1.2 [a]	16.4 ± 4.5 [a]	11.1 ± 2.6 [a]	15.3 ± 3.1 [a]	10.4 ± 1.6 [a]	10.8 ± 7.1 [a]	10.3 ± 1.0 [a]	9.1 ± 0.9 [a]

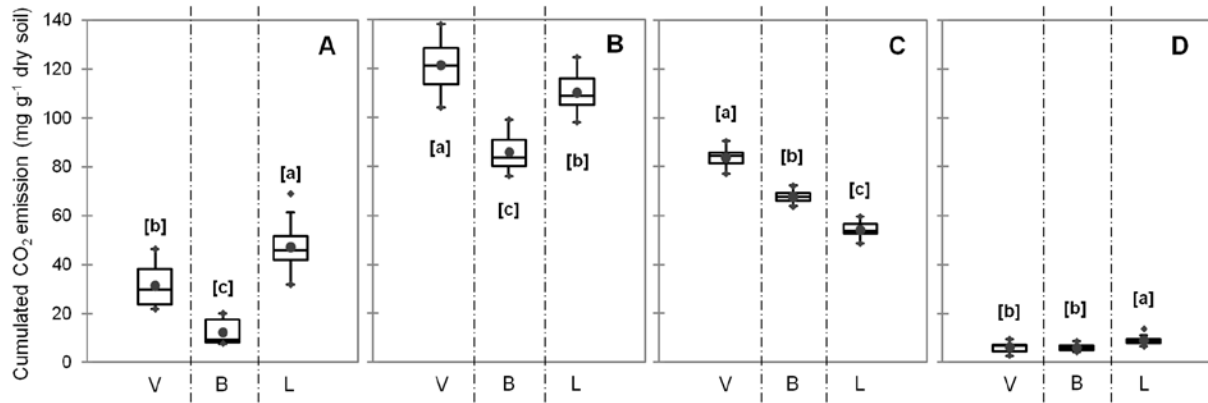
Letters in bracket indicate a significantly different abundance of phyla between the land use intensification of each LTO, according to Fisher test (P<0.05).

## Supporting information



**Supplementary Figure III-S1:** Variation of diversity indexes represented by bacterial (A) and fungal (B) richness (R) and 1/Simpson indexes (1/D) for bacterial (C) and fungal communities (D) for each LTO (Veluwe, Berchida and Lancaster). The richness index represents the number of OTUs defined at the genus level and, for the 1/Simpson index; the high number represents greater diversity. In the whisker box representation, the first (Q1), median, and third (Q3) quartiles are indicated by the bottom, the central, and the top line of the box respectively. The bottom whisker extends to the lowest value of the data set, while the top whisker extends to the highest one. Letters in brackets indicate significant differences between LTO, according to the *Fisher* test ( $P < 0.05$ ).





**Supplementary Figure III-S2:** Variation of areas ( $\text{mg g}^{-1}$  dry soil) under the cumulated  $\text{CO}_2$  emission from different C-cycling activities measured according to the LTO (V: Veluwe, B: Berchida, L: Lancaster) with (A) basal mineralization ( $R_s$  control soil), (B) total mineralization ( $R_t$ ), (C) wheat residues mineralization and (D) Priming Effect. In the whisker box representation, the first (Q1), median, and third (Q3) quartiles are indicated by the bottom, the central, and the top line of the box respectively. The bottom whisker extends to the lowest value of the data set, while the top whisker extends to the highest one. Letters in brackets indicate significant differences between the LTOs, according to *Fisher* test ( $P < 0.05$ ).

**Legend of Supplementary Figure III-S3:** Correlation matrix performed on all biotic (grey background) and abiotic parameters (white background) measured in our study. Abbreviations list : F. silt: Fine silt, C. silt: Coarse silt, F. sa.: Fine sand, C. sa.: Coarse sand, SOC: Soil Organic Carbon, N tot: soil total Nitrogen, C/N: soil C/N ratio, CEC: Cation Exchange Capacity, SMB: Soil Microbial Biomass, R-16S and R-18S: bacterial and fungal richness, H-16S and H-18S: bacterial and fungal Shannon index, J-16S and J-18S: bacterial and fungal evenness, 1/D-16S and 1/D-18S: bacterial and fungal 1/Simpson index. Collinearity between all the explanatory (biotic and abiotic) variables was checked since it has the effect of inflating the variance of the regression coefficients in the models, leading to reduced precision in predicting the response variables (Ramette, 2007). In our case, when the correlation coefficient between two variables was greater than or equal to 0.80 (bold number), one of the two variables was discarded. Based on the correlation matrix, we selected eight variables (underlined) to integrate into the multiple regressions model. Fine sand, pH and C/N were selected due to the absence of strong correlations with other variables. We also chose the SOC, since it is an important factor in the mineralization of soil organic matter. Consequently, the variables that are correlated with the SOC (N, SMB, Clay and Coarse sand) were not taken into account in the model. Regarding the biotic variables, we selected the richness index for both the bacterial and fungal communities (R-16S and R-18S) and the 1/Simpson index for bacteria and fungi (S-16S and S-18S), which did not display any strong correlations with the other abiotic variables selected (SOC, pH, Fine sand and C/N). The soil microbial biomass (SMB) was not selected because of its strong correlation with SOC.



## **Chapitre IV:**

Influence *in situ* de l'historique cultural sur la dynamique des communautés microbiennes du sol après un apport de paille de blé





Les deux premières expériences de ce manuscrit [Chapitre 2 et 3] nous ont permis d'évaluer en conditions contrôlées l'influence de la diversité microbienne sur la stabilité des communautés et sur les activités liées au cycle du carbone. Nos résultats démontrent que la diversité microbienne est un paramètre important dans le fonctionnement biologique du sol. Ces résultats justifient donc l'intérêt et la nécessité d'entreprendre des travaux visant à mieux comprendre la variabilité spatiale et temporelle de la diversité des communautés microbiennes du sol. L'identification des paramètres (propriétés physicochimiques des sols, climat, mode d'usage,...) déterminant la diversité microbienne du sol devrait en effet permettre *in fine* de faire évoluer les modes d'usage du sol au profit de la préservation de la diversité microbienne et des fonctions qu'elle remplit.

C'est dans cette optique que s'inscrivent les travaux présentés dans ce nouveau chapitre. Plus précisément, nos travaux ont pour ambition de contribuer à améliorer nos connaissances sur la dynamique des communautés *in situ*. Très peu de données existent en effet notamment sur la variation saisonnière de la diversité des communautés microbiennes du sol (Lauber *et al.*, 2013). Les objectifs principaux de cette étude étaient :

- 1- d'évaluer *in situ* les variations saisonnières de la diversité des communautés de bactéries et de champignons du sol,
- 2- d'évaluer l'influence de l'historique cultural sur (i) la dynamique des communautés microbiennes (résistance/résilience), et (ii) la composition des successions de populations microbiennes induites par l'apport d'un résidu de blé.

L'intérêt de prendre en compte l'historique cultural du sol était justifié par le fait que de nombreux travaux démontrent que la diversité microbienne est impactée par les pratiques agricoles. En revanche, aucune étude ne rapporte l'influence que peuvent avoir ces modifications sur la dynamique des communautés en réponse aux variations saisonnières et/ou à un apport de matière organique.

Pour ce travail, nous avons mis en place un site expérimental à l'observatoire de recherches en environnement de Lusignan (ORE-ACBB). Le site était composé de deux parcelles caractérisées par un historique cultural différent (prairie (17 ans) vs culture (20 ans)) et le plus proches possible afin de minimiser les différences physiques et chimiques des sols. La végétation sur les deux parcelles a été enlevée pour éliminer l'effet des plantes sur les communautés microbiennes. Sur chacune des deux parcelles 6 placettes ont été délimitées, correspondant à deux traitements réalisés en triplicats : 1 traitement contrôle et un traitement



amendé avec des résidus de blé. Après incorporation du résidu de paille de blé, la dynamique des communautés microbiennes (bactéries et champignons) à été suivi sur 1 an (septembre 2011-2012) *via* le séquençage massif des gènes ADNs ribosomiques 16S et 18S.

Cette étude sera présentée ci-dessous sous la forme d'un article scientifique actuellement soumis pour publication dans la revue *Microbial Biotechnology*.



# **Land use history shifts *in situ* fungal and bacterial successions following wheat straw input into the soil**

Vincent Tardy<sup>1</sup>, Abad Chabbi<sup>2</sup>, Xavier Charrier<sup>2</sup>, Christophe de Berranger<sup>2</sup>, Tiffanie Reignier<sup>1</sup>, Samuel Dequiedt<sup>3</sup>, Céline Faivre-Primot<sup>3</sup>, Sébastien Terrat<sup>3</sup>, Lionel Ranjard<sup>1,3</sup> & Pierre-Alain Maron<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*INRA, UMR 1347 Agroecology, Dijon, France*

<sup>2</sup>*Centre de recherche Poitou-Charentes, INRA, Lusignan, France*

<sup>3</sup>*INRA, Plateforme GenoSol, UMR1347 Agroecology, Dijon, France*

**Correspondence:** P.A. Maron, INRA, UMR1347 Agroecology, 17 rue Sully, 21000, Dijon, France

Email: [pierre-alain.maron@dijon.inra.fr](mailto:pierre-alain.maron@dijon.inra.fr)

**Running title:** Land use history shifts soil microbial decomposers

**Subject Category:** Microbial ecology and functional diversity of natural habitats



## **Abstract**

Soil microbial communities are complex, dynamic assemblages of interacting populations that undergo rapid shifts following modifications in environmental conditions. Although microbial diversity changes may alter soil functioning, the *in situ* temporal dynamics of microbial diversity is poorly documented. Here, we investigated the response of fungal and bacterial diversity to wheat straw input in a field experiment and explored whether this response depended on the soil management history. Wheat was incorporated in field plots that had been under either grass or crops for a long time. The dynamics of microbial diversity was followed over 12 months using 454-pyrosequencing of the 18S-fungal and 16S-bacterial ribosomal genes. Seasonal climatic fluctuations had no effect on the diversity of soil communities. Contrastingly fungi and bacteria responded strongly to wheat straw regardless of the soil history. After straw incorporation, diversity decreased and the community composition changed considerably due to the temporary dominance of a subset of copiotrophic populations. While fungi responded as quickly as bacteria, the resilience of fungal diversity lasted much longer, indicating that the relative involvement of each community might change as decomposition progressed. Soil history did not affect the response patterns, but determined the identity of some of the populations stimulated. Most strikingly, the bacteria *Burkholderia*, *Lysobacter* and fungi *Rhizopus*, *Fusarium* were selectively stimulated. Given the ecological importance of these microbial groups as decomposers and/or plant pathogens, such regulation of the composition of microbial successions induced by plant residue input may have important consequences in terms of soil carbon turnover and crop health.

**Key words:** *land use history/microbial community/pyrosequencing/soil/dynamics/crop residue*





## **1- Introduction**

Soils are highly complex, heterogeneous matrices which shelter a huge diversity of organisms (Swift *et al.*, 1998; Mummey *et al.*, 2006). With thousands of different species hosted per gram of soil, microbial communities account for a large part of this biodiversity (Torsvik & Øvreås, 2002; Roesch *et al.*, 2007). As a major component of the biosphere, soil also offers a support for plant and animal development, human activities, and is directly exposed to variations in climatic conditions. It is consequently a dynamic environment, and there is a considerable body of evidence that soil microbial diversity responds strongly to changes in soil conditions (Gordon *et al.*, 2008; Lauber *et al.*, 2013; Tardy *et al.*, 2013).

One key example is the pattern of microbial community dynamics induced by the addition of organic compounds such as plant debris into the soil (McMahon *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2007; Bastian *et al.*, 2009; Baumann *et al.*, 2009; Marschner *et al.*, 2011; Pascault *et al.*, 2010, 2013). Many studies have indeed reported a progressive and orderly pattern of community development, as regards the concept of species succession commonly employed to explain community dynamics in above-ground terrestrial plant communities (McIntosh & Odum, 1969). Most of the community changes occur during the first month after the input, mainly attributed to fast-growing copiotrophic populations that take advantage of the readily degradable C-compounds (*i.e.* soluble compounds, cellulose, hemicellulose) in the plant residues (Bernard *et al.*, 2007; Pascault *et al.*, 2013; Voříšková & Baldrian, 2013). Subsequently, more specialized slow-growing populations develop on the remaining recalcitrant C-compounds (*i.e.* lignin) due to their greater catabolic capacities compared to the early-stimulated populations (McMahon *et al.*, 2005; Fierer *et al.*, 2007; Baumann *et al.*, 2009; Marschner *et al.*, 2011). Such patterns of diversity dynamics have been demonstrated for bacteria (Pascault *et al.*, 2010, 2013) and fungi (Voříšková & Baldrian, 2013). In addition, since bacteria are assumed to harbor lower capacities for decomposing recalcitrant compounds than fungi (de Boer *et al.*, 2005), it is generally accepted that bacteria dominate the initial stages of decomposition whereas fungi dominate the later stages (Romaní *et al.*, 2006; Poll *et al.*, 2008; van der Wal *et al.*, 2013). However, this is mainly based on quantitative estimates of bacterial and fungal communities. In contrast, studies addressing the response of the taxonomic composition of soil bacterial and fungal communities to plant residues addition are scarce and the relative contribution of bacterial *vs.* fungal diversity to the different stages of plant residues decomposition remains poorly documented (Van der Wal *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014).



In addition, while many studies have shown that land use management (Acosta-Martínez *et al.*, 2008; Jangid *et al.*, 2008, 2011; Drenovsky *et al.*, 2010; Shange *et al.*, 2012) as well as plant litter quality (*i.e.* initial C/N ratio, lignin content, etc...) (Baumann *et al.*, 2009; Pascault *et al.*, 2010, 2013) are important drivers of soil microbial diversity in a given soil, it is not known if the response of soil microbial communities to the addition of a fixed quality of plant residue depends on the soil's history. This question is, however, of major importance since the intensity of the decomposition process and the resulting ecosystem services may depend on the diversity of the microbial populations responding to the input (Baumann *et al.*, 2012; Pascault *et al.*, 2013; Wagg *et al.*, 2014).

The aim of this study was to investigate the importance of soil management history in the response of the taxonomic diversity of bacterial and fungal communities to the incorporation of wheat straw. For this, a field experiment was set up at the long-term observatory of Lusignan (France). Briefly, the site was composed of two adjacent plots, each with a particular land use history (17 years grassland vs. 20 years cropland). Each plot was subdivided into 6 sub-plots, three of which were amended with wheat residues while the other three represented unamended controls. Following wheat addition, the dynamics of microbial diversity (fungal and bacterial) was followed in each sub-plot over a one-year period by high throughput sequencing of ribosomal genes. The site was kept vegetation-free throughout the experiment to avoid an additional response of microbial communities to plant development. To our knowledge this is the first study of the fine *in situ* characterization of the response of bacterial and fungal diversity to seasonal climatic fluctuations and plant residues addition in relation to the soil's land use history.



## **2- Materials and Methods**

### **2.1- Site description and sampling**

The field experiment was set up on the long-term observatory for environmental research at Lusignan, France (SOERE-ACBB, <http://www.soere-acbb.com/index.php/fr/>). The soil on the site is a loamy textured Cambisol and the climate is oceanic with a mean annual temperature and precipitation of 10.5°C and 800 mm, respectively (Chabbi *et al.*, 2009). The experimental site was set up in two phases. First, in April 2011, the two main plots were established (Supplemental Figure IV-1). They were each 5×2 m in size and very close together (separated only by a 5 m pathway), but strongly contrasted in terms of land use history. One plot was set up on a soil that had been under crop rotation (wheat, barley and maize) for 20 years with annual tillage, herbicide crop treatment and nitrogen fertilization (ammonitrate: 100 kg/ha/year). The other plot was set up on permanent grassland (over 20 years old), fertilized (ammonitrate: 150 to 300 kg/ha/year) and harvested (3 to 4 times/year) for annual forage. The vicinity of the two plots was a prerequisite to ensure that differences in physicochemical and biological properties between the two plots were due to land use history, and not to spatial heterogeneity. Each plot (grassland and cropland) was weeded manually (shoots and roots) in order to remove the effect of plants on the soil microbial communities. After weeding, each plot was divided into six 0.7×0.7 m sub-plots (Supplemental Figure IV-1) and the site was left for 5 months to stabilize, with manual weeding every week to remove regrowth seedlings. In September 2011 the soil from each of the 6 sub-plots in each grassland and cropland plot was excavated to a depth of 10 cm. For each plot, soils from 3 of the sub-plots were amended homogeneously by mixing the excavated soil with wheat residues (250 g per sub-plots, corresponding to 5 t dry matter ha<sup>-1</sup>). Wheat residues originated from mature wheat plants (harvested 110 days after sowing) cultivated under controlled conditions (Groupe de Recherches Appliquées en Phytotechnologie, CEA Cadarache, France). The roots were separated from the shoots which were then oven-dried at 65°C for 48 h and cut to obtain straw residues 0.5 cm in length. The C/N ratio determined for wheat was 77.7 (elementar analyser Euro EA (EUROVECTOR, Milano, Italia)). The soil from the 3 other sub-plots was also mixed, but without addition of wheat straw. After mixing, the amended and non-amended soils were returned to their respective sub-plots. In this way, the site was finally composed of two plots, each representing a particular land use history (grassland vs. cropland), with two



treatments per plot represented by triplicate wheat straw-amended sub-plots and triplicate non-amended control sub-plots.

To avoid horizontal transfers of organic matter between control and amended sub-plots, a protective tarp was buried to 30 cm depth around the control sub-plots. In addition, polyethylene safety nets with 10×10-mm diamond mesh were placed on the wheat straw-amended sub-plots to avoid migration of surface applied residues *via* runoff. Soil sampling was carried out regularly from September 2011 to September 2012, with more frequent sampling during the first month following wheat straw incorporation. This represented a total of 10 sampling dates: T0 (date of wheat straw addition); T3; T7; T22; T51; T85; T125; T211; T254; and T365 days, corresponding to 120 soil samples (3 replicates×2 treatments×2 plots×10 dates). After sampling, the soil was sieved to 2 mm, lyophilized and stored at -40°C before DNA extraction. In addition, part of the soil sampled at T0 was air dried for analysis of particle size distribution, pH, Soil Organic Carbon (SOC), Total Nitrogen (N-tot), soil C/N ratio, Soil Organic Matter (SOM), Phosphorous and Cation Exchange Capacity (CEC). Soil physicochemical properties were determined by the Soil Analysis Laboratory of INRA (ARRAS, France, <http://www.lille.inra.fr/las>).

## **2.2- DNA extraction and molecular microbial biomass determination**

Microbial DNA was extracted from 1 g of all 120 soil samples, using a single procedure standardized by the GenoSol platform ([http://www.dijon.inra.fr/plateforme\\_genosol](http://www.dijon.inra.fr/plateforme_genosol)) (Terrat *et al.*, 2012). DNA concentrations of crude extracts were determined by electrophoresis in 1% agarose gel using a calf thymus DNA standard curve, and used as estimates of microbial molecular biomass (Dequiedt *et al.*, 2011). After quantification, DNA was purified using a MinElute gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

## **2.3- Pyrosequencing of 16S and 18S rRNA gene sequences**

Bacterial and fungal diversities were determined at each sampling date, for each triplicate treatment (amended and control) of each land use history (grassland and cropland) by 454 pyrosequencing of ribosomal genes. For bacteria, a 16S rRNA gene fragment with sequence variability and the appropriate size (about 450 bases) for 454 pyrosequencing was amplified by PCR using primers F479 and R888. For fungi, an 18S rRNA gene fragment of about 350 bases was amplified using primers FR1 and FF390. Primers and PCR conditions





were as described previously (Tardy *et al.*, 2013). The PCR products were purified using a MinElute gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified using the PicoGreen staining Kit (Molecular Probes, Paris, France). A second PCR of 9 cycles was then conducted under similar PCR conditions with purified PCR products and ten base pair multiplex identifiers added to the primers at 5' position to specifically identify each sample and avoid PCR bias. Finally, the PCR products were purified and quantified as previously described (Tardy *et al.*, 2013). Pyrosequencing was then carried out on a GS FLX Titanium (Roche 454 Sequencing System).

#### **2.4- Bioinformatics analysis of 16S and 18S rRNA gene sequences**

Bioinformatics analyses were done using the GNS-PIPE developed by the GenoSol platform (INRA, Dijon, France) and initially described by Terrat *et al.*, (2012). First, all reads were sorted according to the chosen identifiers sequences. The raw reads were then filtered and deleted based on their: (a) length, (b) number of ambiguities (Ns), and (c) primer(s) sequence(s). PERL programs were then applied to obtain strict dereplication, alignment of reads using infernal alignments (Cole *et al.*, 2009) and clustered at 95% sequence similarity into operational taxonomic units (OTU) that cluster rare reads with abundant ones, and do not count differences in homopolymer lengths. Another homemade filtering step was then applied to eliminate potential sources of errors (e.g., PCR chimeras, sequencing errors, OTU overestimation). In order to efficiently compare the datasets and avoid biased community comparisons, the samples reads were reduced by random selection closed to the lowest datasets (4,000 and 8,000 reads for 16S- and 18S-rRNA gene sequences respectively). The retained high-quality reads were used for: (i) taxonomy-independent analyses, to determine diversity indices using the defined OTU composition, and (ii) taxonomy-based analysis using similarity approaches against dedicated reference databases from SILVA. The raw data sets are available on the EBI database system under project accession number [PRJEB6118].

#### **2.5- Statistical analysis**

Differences in microbial communities structure between control and wheat-incorporated plots within a given land use history were characterized using UniFrac distances (Lozupone & Knight, 2005). Non Metric Multidimensional Scaling (NMDS) was used to graphically depict differences between microbial communities. Analysis of SIMilarity (ANOSIM, 999 permutations) was used to test the significance of the observed clustering of samples on the ordination plot according to soil history. The difference in change of the



microbial communities in response to wheat straw between the two land use histories was interpreted as the magnitude of the UniFrac distance between the control and the amended plots for each sampling date and was calculated as follows: magnitude of modifications for each sampling date and land use history = [Average of Inter UniFrac distances (control plots/soil-incorporated plots)] – [((Average of Intra UniFrac distances control plots) + (Average of Intra UniFrac distances soil-incorporated plots))/2] (Tardy *et al.*, 2013).

Heat maps were built up by applying the heatmap.2 function implemented in the gplots R package to the relative abundance values of the most dominant bacterial and fungal phyla across the samples (relative abundance > 1%). Each row was scaled so that the mean of each taxonomic group across sample types was calculated and colored according to the corresponding Z score. All these analyses were performed with the R free software (<http://www.r-project.org/>).

Physicochemical parameters, diversity metrics and relative abundances of bacterial and fungal genera were compared between treatments and land use histories by two-way ANOVA and the differences between them by Fisher test ( $P < 0.05$ ). All these statistical calculations were carried out using XLSTAT software (Addinsoft®).

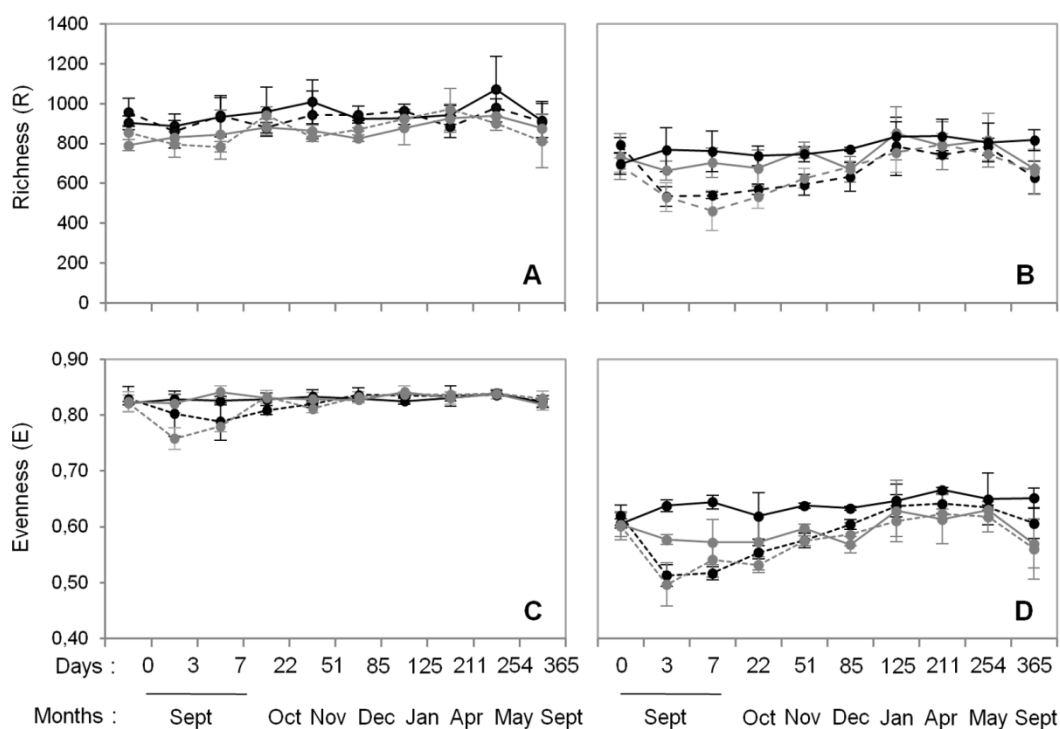
**Table IV-1:** Soil physicochemical characteristics according to land use history at T0.

Parameters	units	Grassland	Cropland
Clay	g/kg	138 ± 3 [a]	130 ± 2 [b]
Fine silt	g/kg	367 ± 5 [a]	365 ± 2 [a]
Coarse silt	g/kg	321 ± 3 [a]	322 ± 3 [a]
Fine sand	g/kg	70 ± 7 [a]	75 ± 3 [a]
Coarse sand	g/kg	102 ± 7 [a]	107 ± 9 [a]
pH	-	6.02 ± 0.11 [a]	6.61 ± 0.05 [b]
SOC	g/kg	13.90 ± 0.41 [a]	10.63 ± 0.29 [b]
N-tot	g/kg	1.22 ± 0.03 [a]	0.98 ± 0.02 [b]
Soil C/N ratio	-	11.38 ± 0.10 [a]	10.85 ± 0.12 [b]
SOM	g/kg	24.05 ± 0.69 [a]	18.42 ± 0.49 [b]
Phosphorous	g/kg	0.09 ± 0.00 [a]	0.10 ± 0.00 [b]
CEC	cmol+/Kg	6.99 ± 0.25 [a]	6.30 ± 0.08 [b]

Abbreviations: SOC: Soil Organic Carbon, N-tot: soil total Nitrogen, SOM: Soil Organic Matter, CEC: Cation Exchange Capacity.

Values are means (n=6) ± standard errors.

Letters in brackets indicate significant differences between cropland and grassland, according to Fisher test (P<0.05)



**Figure IV-1:** Dynamics of bacterial (A and C) and fungal (B and D) richness and evenness during the 12-month experiment in control (full line) and wheat-amended plots (dashed line) for each soil history: grassland (grey) and cropland (black). Error bars denote standard deviation of biological replicates (n = 3).

### **3- Results**

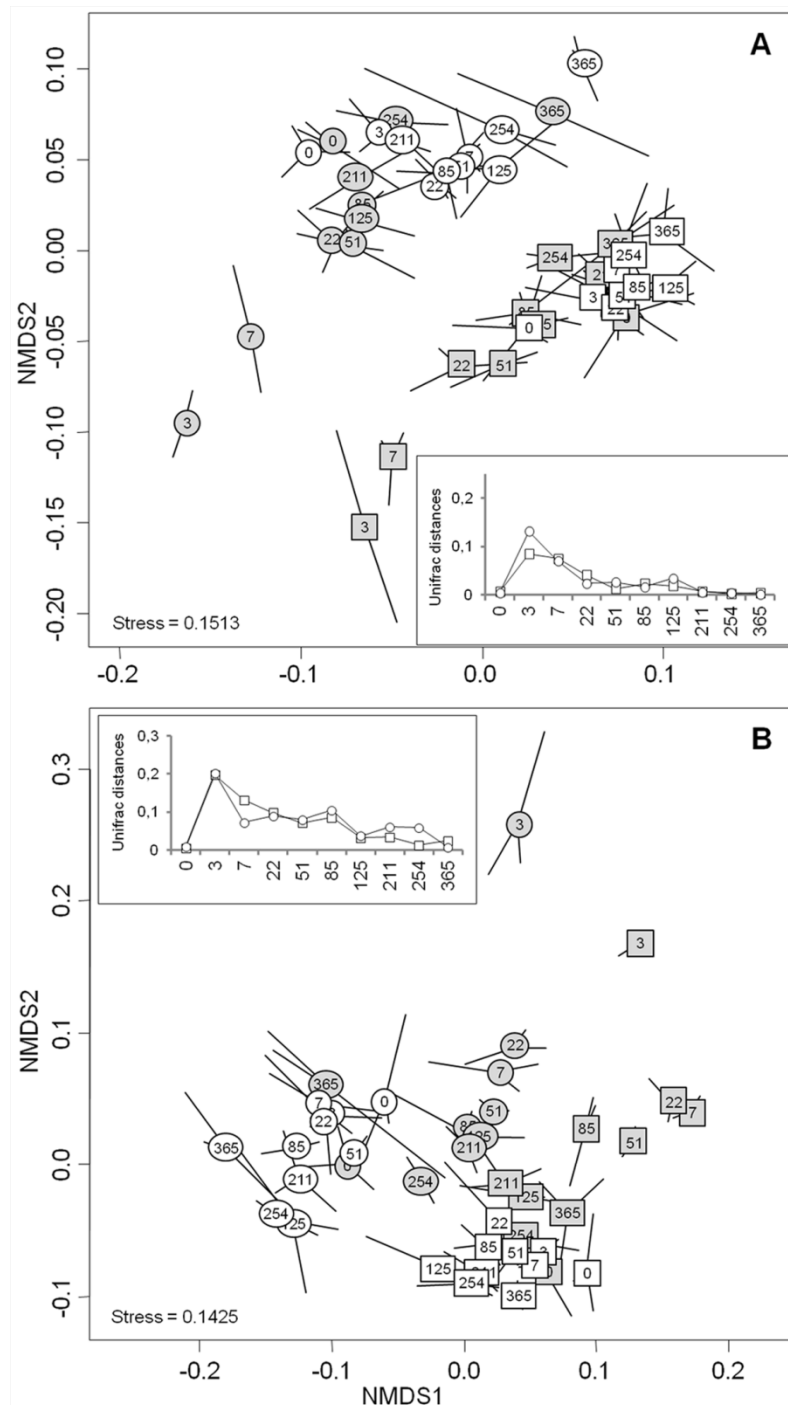
#### **3.1- Soil physicochemical characteristics**

Soil texture corresponded to a loamy sand soil (Table IV-1) and did not differ between the grassland and cropland plots. In contrast, soil chemical properties were slightly but significantly modified by land use history with higher values of SOM, SOC, N-Tot, Soil C/N and CEC in grassland soil, whereas pH and phosphorous content were higher in the cropland soil. No significant difference was observed between cropland and grassland soil for soil microbial biomass (data not shown).

#### **3.2- Impact of land use history and seasonal climatic variations on soil microbial diversity**

Pyrosequencing yielded a total of 1,844,885 and 2,020,216 sequences of 16S- and 18S-rDNA with 4000 and 8000 quality sequences per sample, respectively. Diversity indices calculated from the sequence datasets obtained from control plots (without wheat addition) showed that, overall, both bacterial and fungal richness were higher in cropland plots than in grassland plots whatever the sampling dates (Figure IV-1). Contrastingly, bacterial evenness was similar in the two soils whereas fungal evenness was lower in grassland than in cropland soil. Interestingly, bacterial and fungal diversity indices did not vary significantly during the 12-month experiment whatever the soil history.

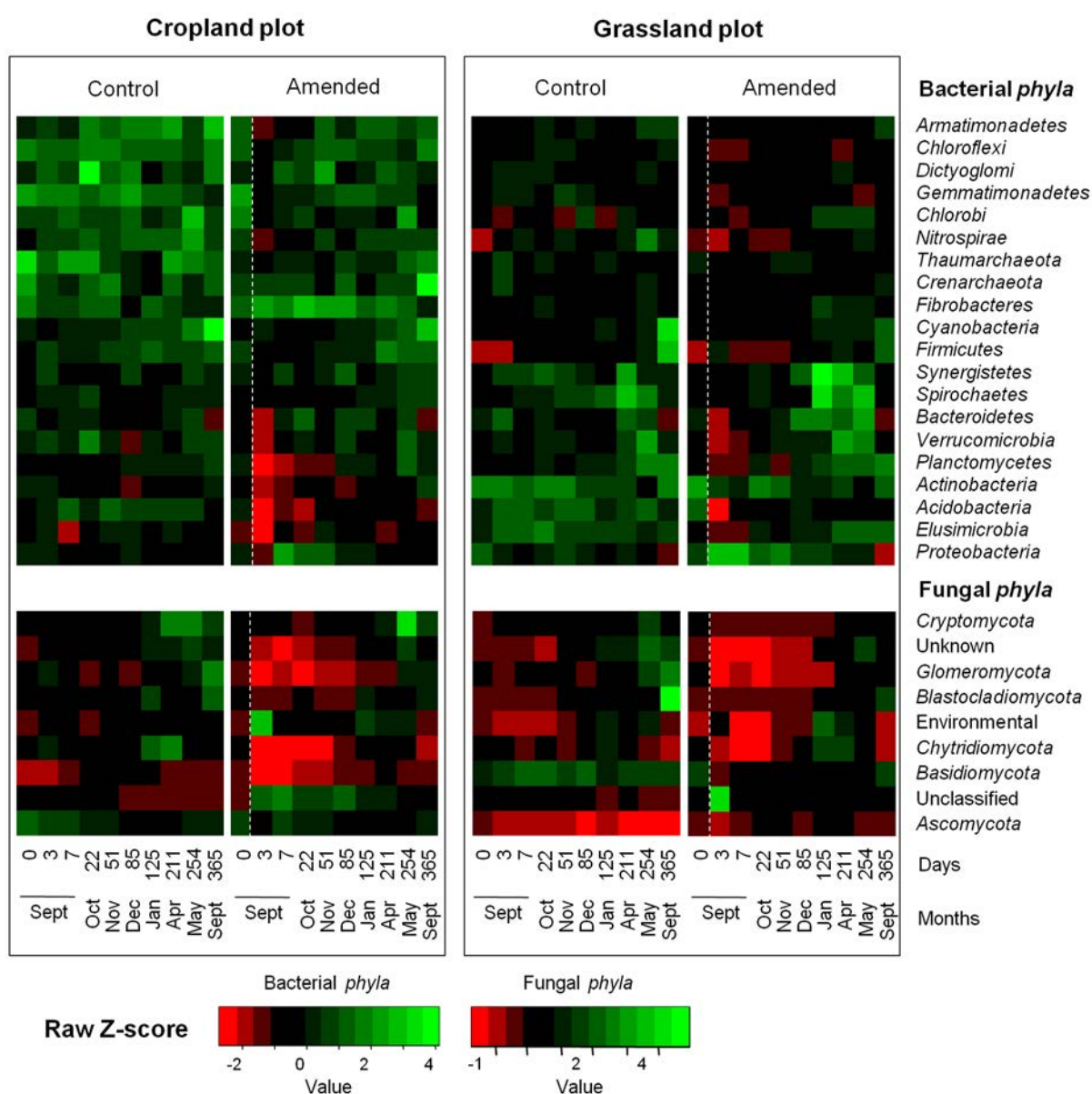
NMDS analysis of the full bacterial- and fungal-sequences datasets highlighted distinct microbial community structure between the control subplots depending on the land use history (Figure IV-2) (confirmed by Pairwise ANOSIM test ( $R=0.805$ ,  $P=0.001$  for bacteria and  $R=0.916$ ,  $P=0.001$  for fungi)). A difference between the two soils was also observed at the OTU level, with only 21.4% of bacterial and fungal OTU being shared at T0 (data not shown). The taxonomic affiliation of 16S- and 18S-rDNA sequences at T0 showed that overall the microbial *phyla* distribution within these two soils was dominated by *Proteobacteria*, followed by *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Chloroflexi* for bacteria, and by *Basidiomycota* and *Ascomycota* for fungi. However, the difference between the two soils was mainly due to an increase in the relative proportions of *Proteobacteria* (58.6 to 54.7 %), *Actinobacteria* (11.8 to 8.5 %), *Acidobacteria* (8.9 to 7.8 %), and *Basidiomycota* (45.3 to 21.2 %) in grassland, as compared to cropland soil which



**Figure IV-2:** Non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) ordination plot derived from weighted pairwise Unifrac distances for **(A)** bacterial and **(B)** fungal communities over time according to soil management history: cropland (squares) and grassland (circles). White labels represent the control treatment and grey labels represent the wheat-amended treatment. Numbers represent sampling dates and lines correspond to the three replicate samples obtained at each sampling date. Stress values for the two ordination plots were  $< 0.2$  which indicates that these data were well-represented by the two dimensional representation. *inset* represents magnitude changes in Unifrac distance between the control and amended sub-plots over the year.

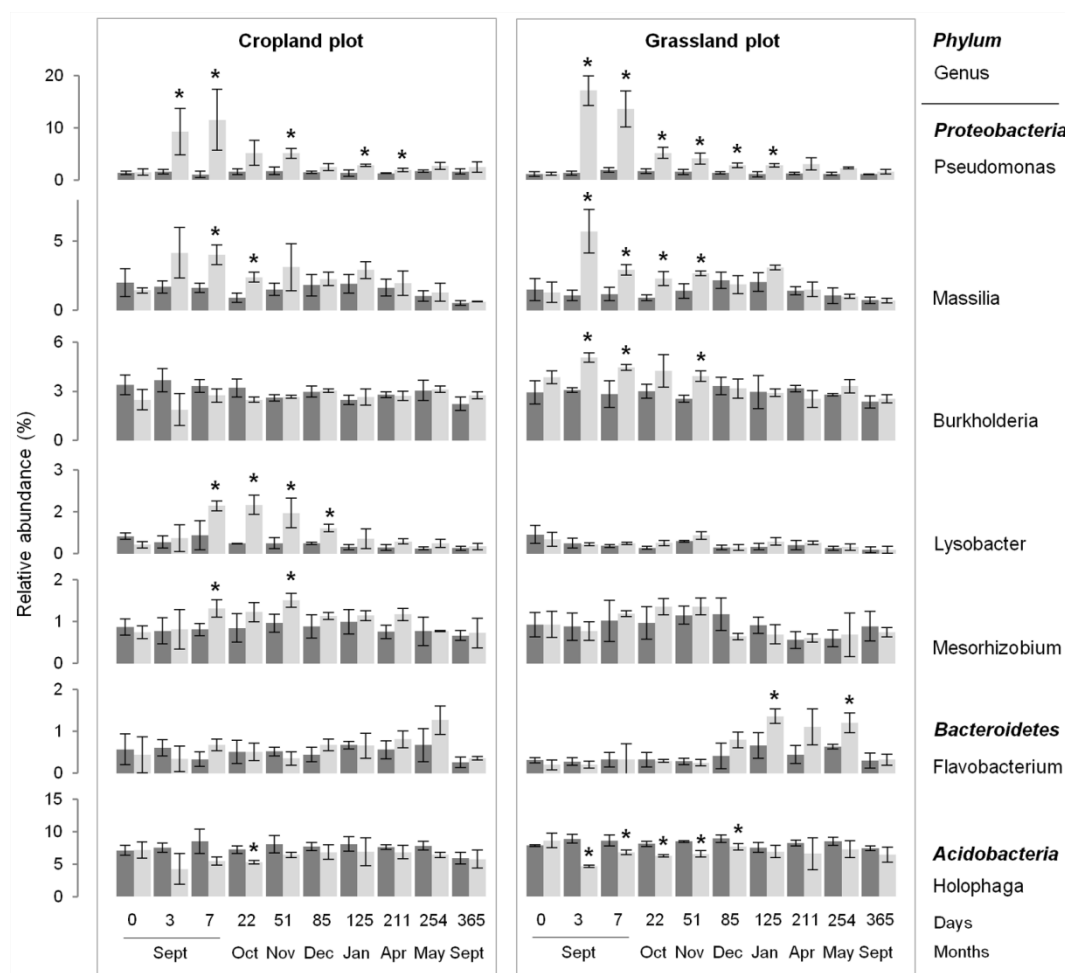
harbored higher relative proportions of *Gemmatimonadetes* (2.4 to 1.2 %), *Chloroflexi* (4.5 to 1.7 %), *Nitrospirae* (1.3 to 0.6 %), and *Ascomycota* (55.7 % to 29 %).

As observed for the diversity indices, bacterial and fungal structure (Figure IV-2) in the controls did not change significantly during the experiment, with all sampling dates being grouped together on the factorial map. This stability of the microbial communities was also observed when the bacterial taxonomic composition was analysed at both *phylum* (Figure IV-3) and *genus* levels (Supplemental Figure IV-S3 and -S4).



**Figure IV-3:** Heat map comparison of bacterial and fungal *phyla* detected in soils according to land management history (cropland and grassland) and treatments (control or amended) over time. In the amended treatment, the white dashed line represents the time of wheat straw input. The captions show the Z-scores (relative abundances are expressed as median centered Z-scores between all samples, and the colors are scaled to the standard deviations. For each sampling date, the average relative abundance was obtained from the biological replicates (n = 3).





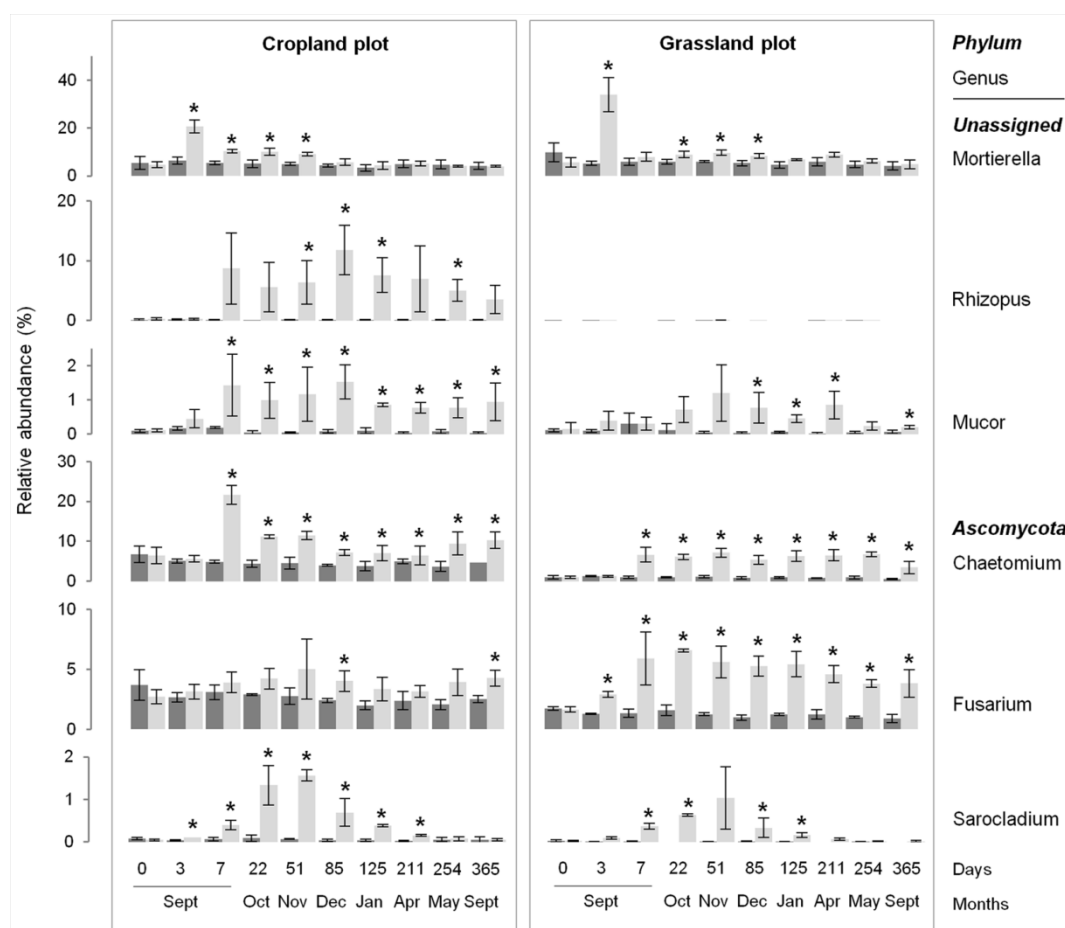
**Figure IV-4:** Dynamics of the relative abundance of some bacterial *genera* over time, according to soil management history (cropland and grassland) and treatment: control (dark grey) and wheat-amended (light grey). Error bars denote standard deviation of biological replicates (n = 3). Asterisks indicate significant difference between control and amended treatments at each sampling date, according to *Fisher* test ( $P < 0.05$ ).

### **3.3- Response of soil microbial diversity to wheat residues according to land use history**

Wheat residues addition led to strong modifications of soil microbial diversity whatever the soil history (Figure IV-1). All microbial diversity indices (bacterial and fungal) were decreased during the first week following straw incorporation (Figure IV-1), except for bacterial richness, which was similar in both control and amended treatments irrespective of soil history (Figure IV-1A). Following this first phase of decline, the indices then increased and were resilient, stabilizing at the level of the respective controls. However, resilience occurred more rapidly for bacteria (22 days for bacterial evenness) than for fungi (85 days for both fungal richness and evenness). In addition, the overall amplitude of the modifications in diversity indices was greater for fungi than for bacteria.

Microbial community structure also responded strongly to wheat addition (Figure IV-2). Similar patterns of community dynamics were observed for bacteria and fungi whatever the soil history, characterized by a highly dynamic phase during the first week after wheat addition followed by a slowdown and resilience of community modification. The community changes peaked after 3 days for both bacteria and fungi whatever the soil history (Figure IV-2), as observed for the diversity indices. However, the amplitude of the structural modifications was greater for fungi than for bacteria, and resilience of the community structure occurred more rapidly for bacteria (51 days) than for fungi (365 days), although the time of occurrence did not depend on the land use history.

Despite the similar community response patterns (Figures IV-1 and IV-2), the community structures (bacterial and fungal) at each sampling date could still be clearly discriminated between the two soils (grassland vs. cropland), indicating that different communities were stimulated by wheat residues (Figure IV-2). This observation was confirmed by the taxonomic composition at the *phyla* and *genera* levels (Figure IV-3). Some microbial *phyla* responded similarly to wheat addition (Figure IV-3) in the two soils. Thus, *Proteobacteria* and the group of sequences “unclassified” to fungal *phyla* were both strongly increased during the early stage following residues input. Other bacterial *phyla*, such as *Nitrospira*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, and *Planctomycetes*, were decreased, as well as the fungal *phyla* *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, and *Glomeromycota*. In addition to these “shared response” groups, some *phyla* responded specifically according to the soil history. For example, the early increase of *Fibrobacteres* (from 3 to 125 days following wheat addition) occurred only in the cropland soil whereas *Synergistetes* and



**Figure IV-5:** Dynamics of the relative abundance of some fungal *genera* over time, according to soil management history (cropland and grassland) and treatment: control (dark grey) and wheat-amended (light grey). Error bars denote standard deviation of biological replicates ( $n = 3$ ). Asterisks indicate a significant difference between control and amended sub-plots at different sampling dates, according to *Fisher* test ( $P < 0.05$ ).

*Bacteroidetes* increased much later (from 85 to 254 days following wheat addition) and only in grassland soil. In the same way, *Ascomycota* increased mainly in the grassland soil throughout the experiment. Analysis of taxonomic composition at the *genera* level provided complementary information to the *phyla* data. For instance, the general increase in *Proteobacteria* was mainly explained by the stimulation of *Pseudomonas* and *Massilia*, whereas *Lysobacter* only increased in the cropland soil, and *Burkholderia* only increased in grassland soil (Figure IV-4). Similarly, the group of sequences “unclassified” to fungal *phyla*, which represented the principal group of stimulated fungal sequences regardless of soil history, mainly consisted of populations affiliated to *Mucor*, for which the relative abundance increased throughout the experiment; *Mortierella*, which also increased in both soils, but just from day 0 to day 3; and *Rhizopus*, which increased strongly in cropped soil but not in grassland soil (Figure IV-5).



## **4- Discussion**

Bacterial and fungal diversity and composition differed according to the soil management history (grassland vs. cropland), as reported in previous studies (Jangid *et al.*, 2011; Orgiazzi *et al.*, 2012). In addition, discrimination between the two soils remained stable throughout the one-year experiment, highlighting the long-lasting nature of the changes induced by past land use (Buckley and Schmidt, 2001; McLauchlan, 2006; Jangid *et al.*, 2011). Since the site was kept weed-free, it is likely that the differences in soil properties accounted for a large part of the microbial communities discrimination between the two soils (Fierer and Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2008; Fierer *et al.*, 2009; Ranjard *et al.*, 2013). While soil texture was similar, as expected because of the vicinity of the two plots, soil chemical properties differed between the grassland and cropland soils. Thus SOC and soil nitrogen content were higher, and pH lower in the grassland soil, in agreement with other studies (McLauchlan, 2006; Smith, 2008). Accordingly, microbial groups previously described as mainly copiotrophic, such as *Proteobacteria* (Fierer *et al.*, 2007; Pascault *et al.*, 2013), or acidophilic, such as *Acidobacteria* (Jones *et al.*, 2009; Naether *et al.*, 2012) were more represented in the grassland soil than in the cropland soil where oligotrophic groups such as *Gemmatimonadetes* were more represented (Bernard *et al.*, 2007; DeBruyn *et al.*, 2011). In addition, *Ascomycota*, one of the most dominant fungal groups in cultivated soils (De Castro *et al.*, 2008; Klaubauf *et al.*, 2010), dominated the fungal community in the cropland soil. Contrastingly, the abundance of *Basidiomycota* and *Actinobacteria*, both described as k-strategists, being favored in more stable systems such as forest (Buée *et al.*, 2009) and natural grassland (Anderson *et al.*, 2003; Acosta-Martínez *et al.*, 2008; Lienhard *et al.*, 2013), was increased in the grassland soil.

In the controls, neither bacterial nor fungal diversity (*i.e.* richness and evenness) nor composition varied significantly during the one-year period despite the climatic variations that occurred at the experimental site (Supplemental Figure IV-1). This contrasted with Lauber and colleagues (2013) who evidenced a significant *in situ* temporal variability of bacterial communities over a 7-month period. These authors showed however that a large proportion of the seasonal variations in bacterial diversity could be explained by the diversity and dynamics of plant cover and the subsequent regulation of C-inputs (*i.e.* root exudates and plant litter). Thus, the observed stability of microbial diversity in our study might be explained by the exclusion of plants. Interestingly, this suggests that under a buffered oceanic climate, as is the



case at our experimental site, the dynamics of plant cover rather than climatic variations may shift microbial diversity during the seasons.

Soil microbial diversity responded strongly to wheat straw incorporation, in agreement with many other studies focused on the impact of plant litter on soil microbial communities (McMahon *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2007; Pascault *et al.*, 2010; Marschner *et al.*, 2011; Voříšková & Baldrian, 2013). Microbial richness and evenness indices showed a transient decrease following amendment, due to the early stimulation of a subset of fast growing bacterial and fungal populations developing on the most easily decomposable straw-compounds (Pascault *et al.*, 2013; van der Wal *et al.*, 2013; Voříšková & Baldrian, 2013). This was in agreement with the patterns of community structure, that were characterized by an initial early and highly dynamic phase followed by a second phase of slower variations leading to a resilience and stability of both bacterial and fungal communities structure. It is noteworthy that for a given community (*i.e.* bacteria or fungi), in spite of initial differences in terms of diversity and composition, neither the variations in diversity indices nor the patterns of community structure differed according to the soil management history. However, the kinetics and amplitude of community response did differ between bacteria and fungi. Surprisingly, the peak in communities' modification, for both bacteria and fungi, occurred three days after the input, indicating that fungi may be as competitive as bacteria for fast development on freshly incorporated wheat straw. This is not in agreement with the commonly accepted idea that differences in physiology and metabolic capacities between bacteria and fungi may confer an advantage to bacteria over fungi during the early stages of decomposition (de Boer *et al.*, 2005; Paterson *et al.*, 2008; Poll *et al.*, 2008). However, recent studies using <sup>13</sup>C labelling of plants also showed that decomposer fungi may contribute significantly to the decomposition of simple root exudates (De Deyn *et al.*, 2011; Hannula *et al.*, 2012). In addition, the quality of the wheat straw, characterized by a high C/N (77.7), may also have contributed to the concomitant, early stimulation of bacterial and fungal populations, as well as the greater amplitude of the diversity modification observed for fungi compared to bacteria. Indeed, fungi are known to be better equipped than bacteria for decomposing recalcitrant organic C-compounds (Romaní *et al.*, 2006; Poll *et al.*, 2008; van der Wal *et al.*, 2013) and the decomposability of the litter entering the soil is likely to be of major importance in determining the sequential stimulation of bacteria and fungi during the early phase of decomposition. In other respects, the better enzymatic abilities of fungal populations may explain why fungal communities responded up to 122 days whereas





modifications of the bacterial communities occurred only during the first month (22 days) after wheat addition. This slower resilience of fungal diversity, as compared to that of bacteria, suggests that fungi may dominate the latter stages of wheat straw decomposition (de Boer *et al.*, 2005; Poll *et al.*, 2008).

While the patterns of bacterial and fungal diversity indices and communities structure were similar, regardless of soil history, some of the populations entering the successions differed. Several bacterial *phyla*, such as *Nitrospira*, *Verrumicrobia*, *Acidobacteria* and *Planctomycetes*, were decreased by wheat straw incorporation, which was in agreement with other studies showing that these *phyla* are probably mainly composed of oligotrophic slow-growing populations (Bernard *et al.*, 2007; Fierer *et al.*, 2007; Pascault *et al.*, 2013). Contrastingly, *Bacteroidetes* were stimulated by wheat straw, but in the latter stages of wheat decomposition (*i.e.* 5 months after wheat addition), in agreement with previous results (Pascault *et al.*, 2010). The *Proteobacteria* phylum was increased rapidly regardless of the soil history, as reported previously (Aneja *et al.*, 2006; Pascault *et al.*, 2010). This global increase was mainly due to the stimulation of two *genera* occurring in both soils: *Pseudomonas* and *Massilia* that had previously been described as mainly copiotrophic bacteria being stimulated by inputs of wheat straw or more soluble C-compounds (Bernard *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 2010; Ofek *et al.*, 2012). Interestingly, in addition to these *genera*, *Burkholderia* was enhanced only in the soil with a grassland history whereas *Lysobacter* was enhanced only in the soil with a cropland history. Recent studies also reported stimulation of *Burkholderia* species by plant residue inputs into the soil (Kim *et al.*, 2014), probably because of the strong catabolic versatility of these species which enables them to degrade a wide range of C-compounds including cellulose (Suárez-Moreno *et al.*, 2012). Since this *genus* is also known to be closely associated with plants in the rhizosphere (Kim *et al.*, 2014), it is likely that the long grassland history, characterized by permanent plant cover with a very dense root network, may have led to the selection of a particular diversity of *Burkholderia* species, compared to the adjacent cropland, hence explaining the observed discrepancy between the responses of the two soils. However, differential stimulation of this *genus* may be of significance for subsequent crops since many *Burkholderia* species are associated with plants in positive (*i.e.* growth promoting species) or negative (*i.e.* pathogens) interactions (Suárez-Moreno *et al.*, 2012). Similarly to *Burkholderia*, *Lysobacter* is known to possess strong lytic abilities to degrade various biomacromolecules (Postma *et al.*, 2011). However, this *genus* has also been shown to decrease with decreasing soil pH (Postma *et al.*, 2011), which may explain



why stimulation was observed in the cropland soil (pH 6.6), but not in the grassland soil (pH 6.0). Altogether, these results suggest that the modulation in diversity of the populations responding to plant litter input, according to the past history of the soil, may be determined either by the actual soil properties or by the diversity of the decomposers resulting from past interactions with plant cover.

Regarding the fungal communities, the observed initial decrease of the diversity indices was due to the massive increase of *Mortierella*, which represented up to 20 and 30% of the sequences identified at T3 in the cropland and grassland soils, respectively. This strong stimulation, observed only three days after wheat straw incorporation, suggests that this *genus* may be as competitive as bacteria in decomposing the most decomposable straw C-compounds. This is in agreement with other reports that *Mortierella* are fast growing fungi developing on substrates rich in simple carbohydrates (Deacon, 2006; Richardson, 2009). In addition, their ability to produce chitinolytic enzymes may make them successful competitors among other fungi (Deacon, 2006), which could explain their massive and exclusive development observed at T3. Nevertheless, this competitive advantage may be limited to decomposition of the most soluble wheat compounds since *Mortierella* decreased from T7 and was replaced by a diversity of other newly stimulated fungi. As for bacteria, some of these new populations were shared or specifically stimulated depending on the soil history. For example, *Mucor* and *Chaetomium* were stimulated in both soils from T7 and throughout the year of experimentation, in agreement with their known contribution to plant debris decomposition in soil due to their cellulolytic, hemicellulolytic and lignolytic abilities (Fathallah Eida *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011). The *genus Sarocladium* was also stimulated in both soils, but only transiently, with a peak observed at T51. Interestingly, two fungal *genera* responded specifically depending on the soil history. Most strikingly, *Rhizopus* was very weakly represented in the controls of both soils, but responded strongly and lastingly to wheat straw incorporation in the cropland soil (representing up to 15 % of the sequences identified) but not in the grassland soil. This *genus* is a common soil mold which develops on decomposing plant litter in soil (Richardson, 2009). However, we cannot explain why it only responded in the cropland soil. It is possible that this selective stimulation could be of significance for the health of subsequent crops since some *Rhizopus* species are described as plant pathogens (Deacon, 2006). In contrast to *Rhizopus*, *Fusarium* was one of the dominant fungi in both soils and was strongly stimulated in the grassland soil but not in the cropland soil. This *genus* is known to be saprophytic, widely distributed in soil and often associated with



plant debris (Silvestro *et al.*, 2013). A similar stimulation of *Fusarium* populations following crop residues incorporation, and the strong influence of the residues composition on the structure of the *Fusarium* community, has already been reported (Wakelin *et al.*, 2008). Here, we show that the stimulation of *Fusarium* by plant residues may also depend on the past use of the soil. In addition to potential repercussions in terms of carbon mineralization, this differential stimulation between the two soils may have consequences for subsequent crops since this fungus is strongly associated with several diseases that cause crop yield losses and mycotoxin contamination of grain (Silvestro *et al.*, 2013).

This study provides new insights into the *in situ* dynamics of the diversity of bacterial and fungal communities in soil. It shows that seasonal fluctuations of climatic conditions may have little impact on the diversity of these communities. While long-term differences in land use management impacted soil microbial diversity, they did not affect the patterns of community response to wheat straw incorporation in terms of diversity indices and community structure variations. Fungal diversity responded as quickly as bacterial diversity but the resilience of fungal communities lasted longer, which would indicate that whereas bacteria and fungi may both play a major role during the initial stages, fungi may dominate the latter stages of wheat decomposition. Despite similar response patterns, the identity of some of the bacterial and fungal populations in the successions was dependent on soil history. Among the specifically stimulated populations were bacterial and fungal populations of particular ecological importance, such as *Burkholderia* or *Fusarium*, both recognized for their involvement in the decomposition of organic matter, but also for their impact on crops health. This effect of soil history on population successions during the decomposition of a given quality of plant litter had not been evidenced previously. It is however of major importance since it highlights that the diversity of microbial decomposers may be driven by soil management history, with potential consequences in terms of plant residues decomposition, a transformation of significance for the C-balance in the soil environment.

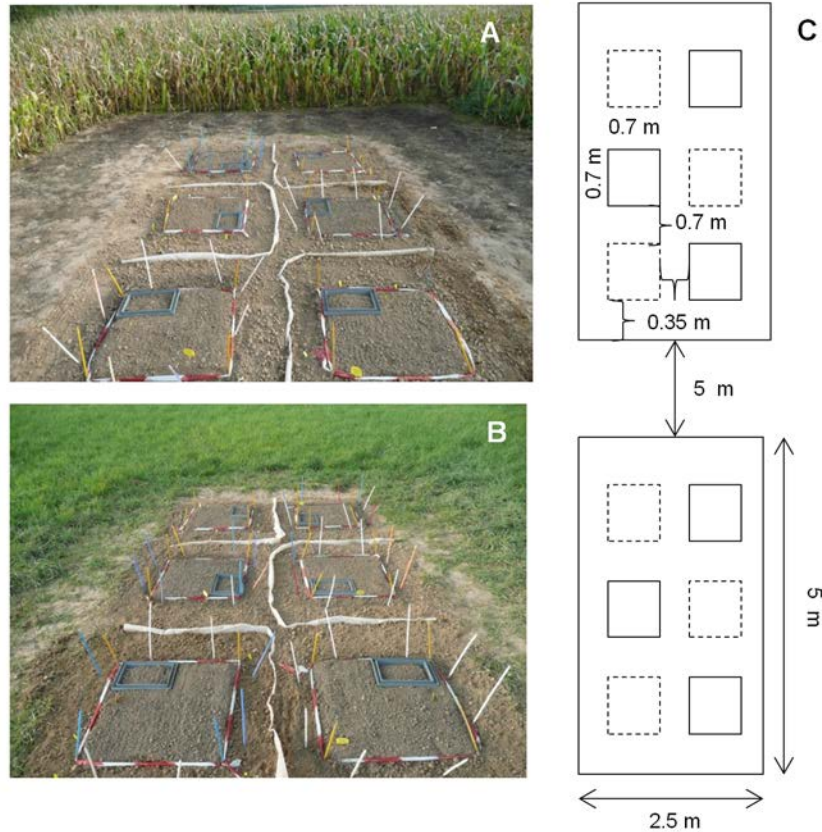
## **Acknowledgements**

This work was supported by the Agence Nationale de Recherche (ANR) as part of the ANR Systerra project DIMIMOS (ANR-08-STRA-06) and by a grant from the Regional Council of Burgundy. It benefited from the technical facilities of the GenoSol platform of the infrastructure ANAEE-France [ANALysis and Experimentations on Ecosystems, ANR project



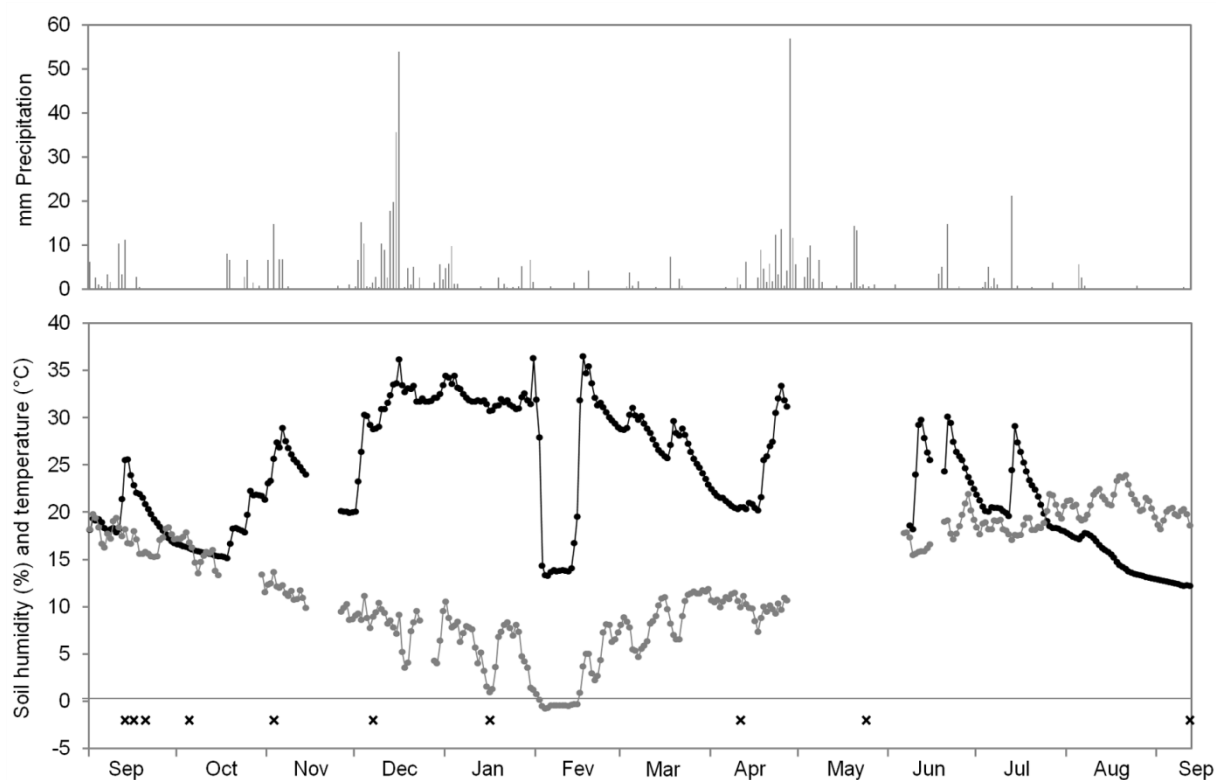
'Investments for the Future' (ANR-11-INBS-0001)], as well as from the ORE-ACBB (<http://www.soere-acbb.com/index.php/fr/>).

## Supporting Information

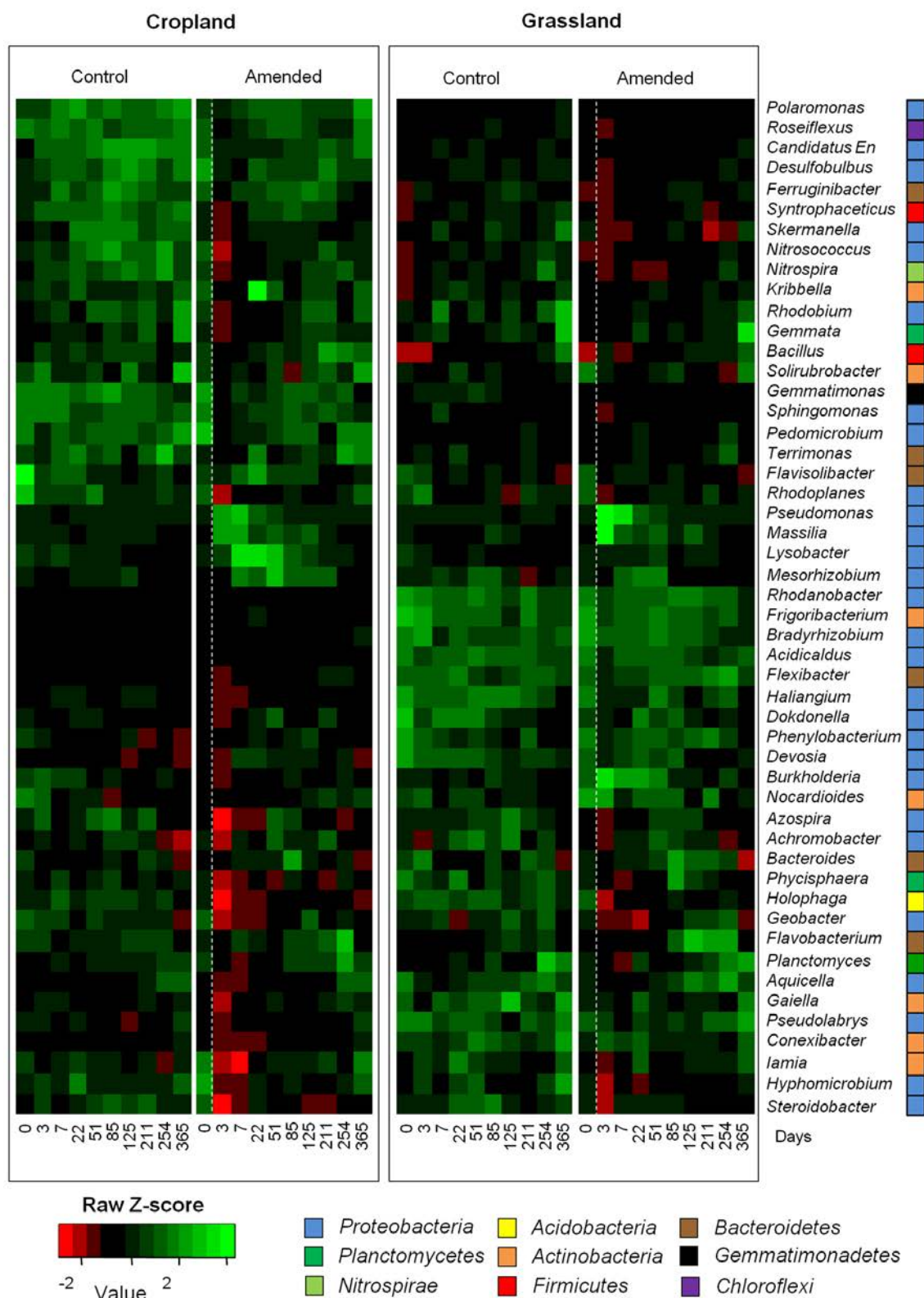


**Supplemental Figure IV-1** Organization of the experimental site set up at the SOERE-ACBB (Lusignan, France). Pictures of the cropland (**A**), and grassland plot (**B**) associated with their respective diagrammatic representations (C and D). The two plots (2.5 × 5 m) were separated by a 5 meters pathway. Each plot was divided into 6 subplots of 0.49 m<sup>2</sup> (0.7 × 0.7), with 3 subplots amended with wheat straw (dotted line), and 3 unamended control subplots (full line).



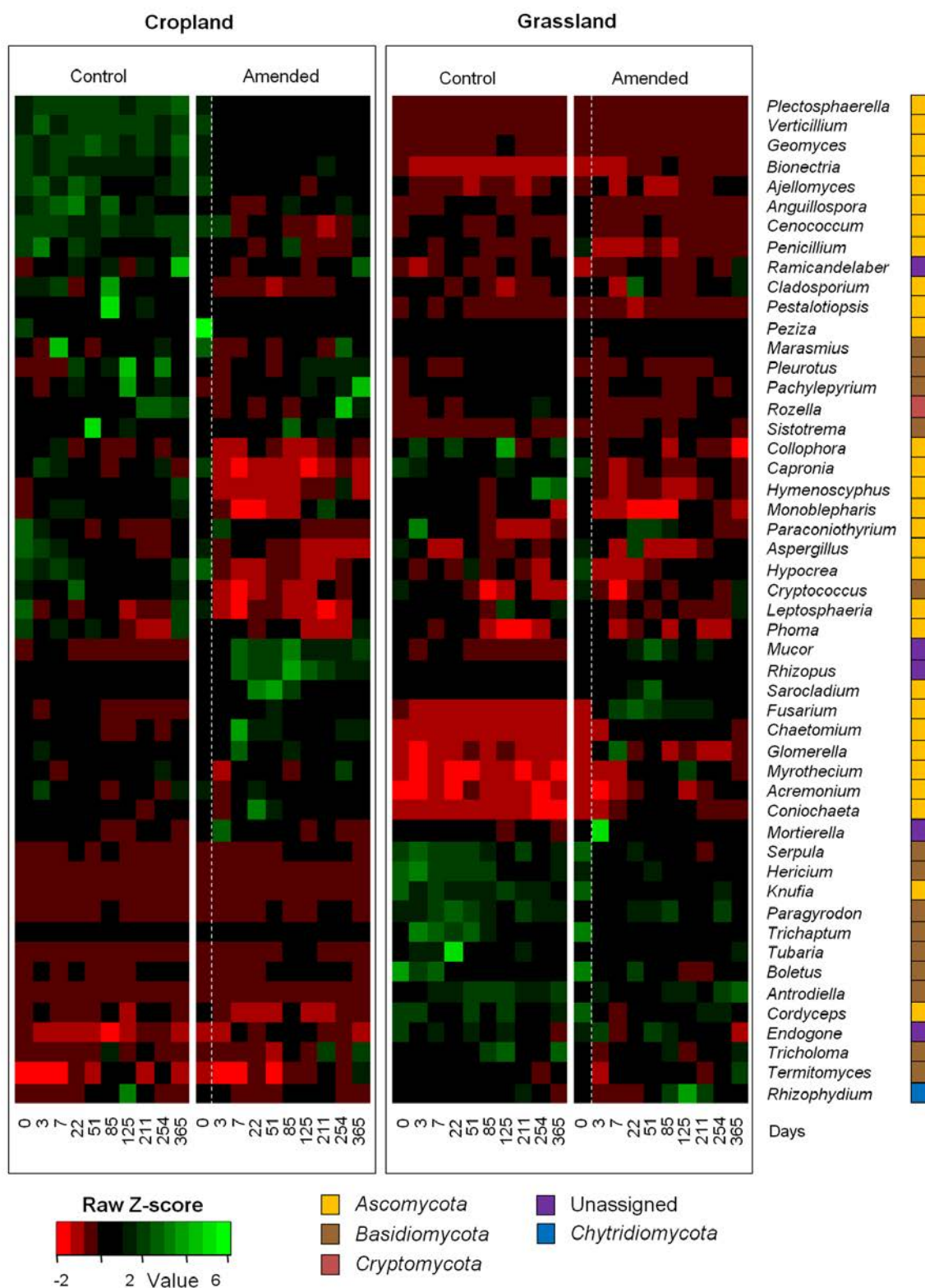


**Supplemental Figure IV-2:** Changes in the climatic parameters at the site during the 1-year period (01/09/2011 to 13/09/2012). Precipitation (A), soil humidity (black line) and temperature (grey line) (B). All these data were provided by the SOERE-ACBB (<http://www.soere-acbb.com/index.php/fr/>). Signs (×) indicate time points when soils were sampled for the biological molecular analysis.



**Supplemental figure IV-3:** Heat map comparison of bacterial *genera* (relative abundance > 1%) detected in soils according to land management history (cropland and grassland) and treatments (control or amended) over time. In the amended treatment, the white dashed line represents the time of wheat straw input. The legend shows the Z-scores (relative abundances are expressed as median centered Z-scores between all samples, and the colors scaled to standard deviations). For each sampling date, the average of relative abundance was based on the biological replicates (n = 3).





**Supplemental figure IV-4:** Heat map comparison of fungal *genera* (relative abundance > 1%) detected in soils according to land management history (cropland and grassland) and treatments (control or amended) over time. In the amended treatment, the white dashed line represents the time of wheat straw input. The legend shows the Z-scores (relative abundances are expressed as median centered Z-scores between all samples, and the colors scaled to standard deviations). For each sampling date, the average of relative abundance was based on the biological replicates (n = 3).



# **Chapitre V:**

## **Conclusion générale et perspectives**



## 1- Rappel des principaux objectifs de la thèse

Les communautés microbiennes jouent un rôle majeur dans le fonctionnement biologique du sol, notamment à travers leur implication dans les cycles biogéochimiques (C, N, P, etc.). Cependant, la diversité de ces communautés au sein des écosystèmes est régulièrement modifiée par des perturbations liées aux activités humaines (agriculture, industrialisation, urbanisation) et la question de l'impact de ces modifications pour le maintien des fonctions biologiques du sol et des services écosystémiques associés est aujourd'hui centrale. Dans ce contexte, l'objectif général de ce travail de thèse était de tester l'importance de la diversité pour :

- la stabilité (résistance/résilience) structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes (bactéries et champignons) du sol en réponse à une perturbation,
- l'intensité des transformations impliquées dans le turnover de la matière organique dans le sol, une fonction déterminante pour la fertilité des sols, la qualité de l'environnement et les changements climatiques.

La stratégie de ce travail a reposé sur (i) des expérimentations en conditions contrôlées (microcosmes de sols) pour ne faire varier que le paramètre à tester (la diversité microbienne), et (ii) sur des expérimentations au champ afin d'intégrer la variabilité des paramètres pédoclimatiques.

## 2- Conclusions

### 2.1- Relation diversité - stabilité structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes

Le premier objectif de mon travail de thèse a été de tester en conditions contrôlées l'influence de la diversité sur la stabilité (résistance et résilience) des communautés microbiennes en réponse à deux types de perturbation (rémanente *vs.* non rémanente). Dans cette étude, notre première étape a été de créer différents niveaux de diversité microbienne. Pour cela, nous avons utilisé la technique de dilution-extinction qui permet de manipuler la diversité microbienne sur un même sol, éliminant ainsi les effets des paramètres physicochimiques sur les activités mesurées (Wertz *et al.*, 2006; Baumann *et al.*, 2012; Philippot *et al.*, 2013). L'utilisation de cette approche a été concluante, puisque nous avons créé trois niveaux de diversité microbienne (fort ; D0, moyen ; D3 et faible ; D5), chacun



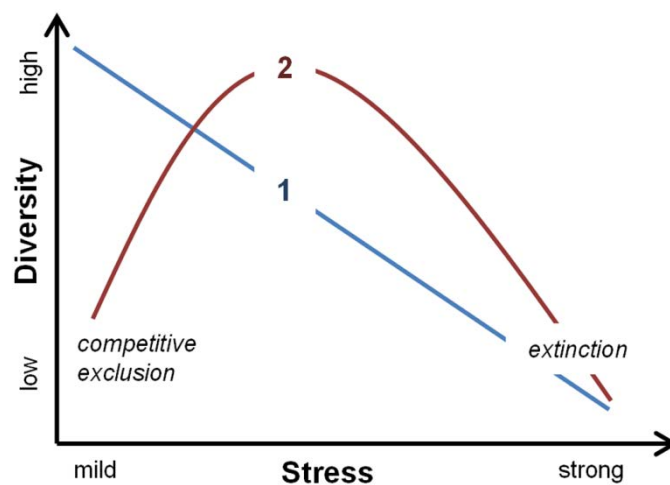


caractérisé par une structure, une composition et des niveaux de diversité (richesse et evenness) des communautés microbiennes différents.

Après l'application des perturbations (pollution au mercure et stress thermique), nos résultats ont montré que la stabilité fonctionnelle (respiration du sol) et structurale (structure génétique des communautés) était plus importante pour les communautés microbiennes riches en espèces. Ces observations sont en accord avec le concept d'assurance écologique proposé par Yachi et Loreau (1999) et suggèrent que dans un environnement fluctuant, la diversité microbienne est un paramètre biologique important pour assurer le maintien des fonctions écosystémiques réalisées par les communautés microbiennes. Dans un contexte agricole, ces résultats suggèrent que la préservation et l'optimisation de la diversité microbienne pourrait être une piste pour améliorer la durabilité des systèmes agricoles. Pour parvenir à une telle gestion, des travaux sont encore nécessaires afin d'évaluer l'impact des pratiques agricoles sur la diversité des composantes microbiennes du sol.

Un autre résultat original de ces travaux montre que la diminution de la diversité microbienne n'a pas été associée à une baisse progressive de la stabilité fonctionnelle et structurale des communautés. Quelle que soit la perturbation appliquée, nos résultats montrent en effet l'existence de « seuils » correspondant à des niveaux minimums de diversité microbienne nécessaires au maintien du fonctionnement biologique en réponse à des perturbations de l'environnement sol. Ces seuils diffèrent toutefois selon la perturbation. Par exemple, la structure génétique des communautés microbiennes pour la diversité moyenne et élevée (D0 et D3) était plus stable que pour les communautés faiblement diversifiées (D5) lorsque le sol était soumis à un stress thermique. Cependant, lorsque le sol est soumis à une pollution métallique, la stabilité des communautés était affectée dès la première baisse de diversité (stabilité D0 > stabilité D3 et D5). De notre point de vue, l'observation de différents seuils de diversité selon le type de perturbation ouvre de nouvelles pistes, tant en termes de recherches que d'applications. Par exemple, il serait intéressant de tester cette notion de seuils en réponse à différentes pratiques agricoles ou différentes intensités d'une même pratique afin de (i) de mieux comprendre les mécanismes déterminant la stabilité des communautés microbiennes, et (ii) de pouvoir hiérarchiser ces pratiques en termes d'impact potentiel sur la durabilité du fonctionnement biologique du sol.

Bien que nous observions une relation positive entre la diversité microbienne et la stabilité structurale et fonctionnelle, notre analyse s'est limitée à un seul type de sol avec une



**Figure V-1:** Modèles hypothétiques de l'effet de l'application d'un stress sur la diversité des communautés microbiennes. Dans le **modèle 1**, l'augmentation du stress entraîne une diminution de la diversité au sein des communautés microbiennes. Dans le **modèle 2**, lorsque l'intensité du stress est faible, il est supposé que les espèces les plus compétitives dominent la communauté conduisant à une diminution de la diversité. Lorsque le stress augmente, ces espèces perdent leur avantage compétitif et d'autres espèces peuvent proliférer (augmentation de la diversité dans la communauté). En revanche, pour un stress fort, l'extinction progressive d'espèces entraîne une diminution de la diversité comme pour **le modèle 1** (d'après Giller *et al.*, (1998)).

seule et même communauté microbienne ré-inoculée. Or, on sait par exemple que les propriétés physico-chimiques des sols (argiles, matière organique, etc.) peuvent influencer la réponse des communautés microbiennes suite à une perturbation (Griffiths & Philippot, 2013). De même le niveau de redondance fonctionnelle, déterminé par la composition de la communauté microbienne, est sans doute un paramètre important pouvant moduler la relation observée. Par conséquent, bien que cette étude constitue en soi une preuve importante de concept sur la relation diversité/stabilité microbienne, la généralisation des résultats obtenus nécessitera la réalisation d'autres travaux prenant en compte la variabilité (i) des paramètres physicochimiques du sol, et (ii) de la diversité des communautés microbiennes.

## **2.2- Relation intensité d'usage du sol - diversité microbienne – cycle du carbone**

La deuxième partie de mon travail de thèse avait pour objectif d'évaluer la généralité des résultats obtenus dans les conditions expérimentales simplifiées du chapitre précédent sur l'importance de la diversité microbienne pour le turnover de la matière organique du sol. Dans cette expérimentation, nous avons décidé d'analyser des sols avec des communautés microbiennes indigènes (et non plus ré-inoculées) et dont le niveau de diversité et la composition taxonomique étaient modulés par l'utilisation du sol (et non pas manipulées expérimentalement). Pour cela, notre analyse s'est appuyée sur des sols provenant de trois sites européens aux pédoclimats contrastés (Sardaigne, Angleterre et Hollande), chacun caractérisé par un gradient d'intensification de l'utilisation des terres.

Nos résultats ont montré que les gradients d'intensification de l'utilisation des terres ont impacté significativement la diversité et la composition des communautés microbiennes sur les trois sites Européens. Ces résultats sont cohérents avec la littérature (De Vries *et al.*, 2006; Acosta-Martínez *et al.*, 2008, 2010; Shange *et al.*, 2012; Lienhard *et al.*, 2013) et suggèrent que les pratiques agricoles sont un « driver » important des communautés microbiennes du sol.

Un résultat original de ces travaux est que l'intensification de l'utilisation des terres n'était pas nécessairement associée à une diminution de la diversité microbienne du sol (richesse, 1/Simpson). En effet, de manière générale, une diversité plus élevée a été observée pour les niveaux moyens de l'intensité de l'utilisation des terres par rapport aux niveaux faibles et forts. Ces résultats nous ont permis de démontrer que la théorie du stress intermédiaire ou « Hump-back model » décrivant la réponse d'une communauté à un stress (Connell, 1978; Giller *et al.*, 1998; figure V-1) peut s'appliquer pour la réponse des



communautés microbiennes à des perturbations liées à l'utilisation des terres. Par conséquent, ces résultats peuvent avoir des applications importantes puisqu'ils suggèrent qu'il est possible d'améliorer les ressources génétiques des sols par une gestion appropriée des systèmes agricoles.

Les intensités des activités mesurées après l'incorporation du résidu de blé dans les microcosmes de sol ont été très différentes selon le niveau d'intensification de l'utilisation des terres. L'analyse en partition de variance nous a permis de hiérarchiser les paramètres biotiques et abiotiques qui pouvaient expliquer ces différences. Nos résultats ont confirmé l'importance de paramètres abiotiques tels que la teneur en SOC et la composition de la matière organique (C/N) pour la détermination de l'intensité des transformations du carbone dans le sol. De façon plus novatrice, ils ont également démontré :

- que les paramètres biologiques microbiens (1/Simpson, richesse) pouvaient expliquer jusqu'à 80% des variations des activités de décomposition mesurées,
- que l'importance relative de la diversité des communautés de bactérie et de champignon pour la détermination de l'intensité des flux de carbone dépend du pool de matière organique décomposé (matière organique du sol vs. résidu végétal apporté).

Dans la majorité des cas, l'augmentation de la diversité était corrélée à une augmentation de l'intensité de l'activité mesurée. En accord avec les travaux exposés dans la partie précédente, ainsi qu'avec d'autres travaux (Bell *et al.*, 2005; Baumann *et al.*, 2012), ces relations positives montrent que la diversité microbienne n'est pas un paramètre neutre pour les transformations du cycle du carbone dans le sol.

Parmi les activités mesurées, le « Priming Effect » (sur-minéralisation de la matière organique du sol induite par l'apport de matière organique « fraîche ») était le seul processus dont la variance n'était pas expliquée par les paramètres biologiques de notre modèle. Cette absence de relation suggère (i) que ce processus serait régi essentiellement par des paramètres abiotiques, ou (ii) que les paramètres biotiques pris en compte dans le modèle ne sont pas ceux qui déterminent l'intensité de ce processus. En accord avec le second point, plusieurs auteurs font l'hypothèse que l'intensité du priming effect dépendrait plus spécifiquement de la composition des communautés microbiennes (présence de groupe/population particulière, comme les stratégies-r et -K) (Garcia-Pausas & Paterson, 2011; Pascault *et al.*, 2013) que de la richesse microbienne prise en compte dans notre modèle.



En conclusion, ces résultats suggèrent qu'il est possible de « piloter » la diversité microbienne du sol *via* les pratiques agricoles pour améliorer le fonctionnement du cycle du carbone et les services écosystémiques associés. Par ailleurs, l'approche utilisée a permis de hiérarchiser les paramètres biotiques et abiotiques qui déterminent l'intensité des flux de carbone dans le sol. La généralisation de cette approche à une large gamme de sol représentative de la variabilité des types de sol, des modes d'usage et de la diversité des communautés microbiennes pourrait maintenant permettre d'affiner (i) l'identification des paramètres microbiens les plus explicatifs de l'intensité des flux de carbone, et (ii) la détermination de leur poids relatif par rapport aux autres paramètres abiotiques (température, humidité, quantité et qualité de la matière organique). *In fine*, ce travail pourrait sans doute ouvrir de nouvelles voies vers l'intégration de ces paramètres microbiens pour la modélisation des flux de carbone au sein des écosystèmes.

### **2.3- Influence *in situ* de l'historique cultural sur la diversité des successions microbiennes induites par l'apport d'un résidu de blé**

Après avoir validé nos deux premiers objectifs, la troisième partie de mes travaux de thèse avait pour finalité de mieux comprendre la variabilité temporelle de la diversité des communautés microbienne du sol. La mise en place d'un dispositif expérimental sur le site de Lusignan (ORE-ACBB) a permis d'évaluer, *in situ*, comment l'historique cultural du sol (prairie *vs.* culture) peut altérer (i) la diversité des communautés microbiennes (bactéries et champignons) et (ii) leur dynamique en réponse aux variations saisonnières et/ou à l'apport de résidus de paille de blé au sol.

Les résultats montrent que 5 mois après le désherbage des parcelles, la structure et la composition taxonomique des communautés de bactéries et de champignon sont différentes entre les placettes des parcelles prairie et culture, et que cette discrimination demeure tout au long des 12 mois de l'expérimentation. Ces résultats confirment donc ceux du chapitre 3, à savoir qu'il est possible de modifier durablement la diversité des communautés microbiennes *via* le mode d'usage du sol.

Le suivi pendant 1 an de la diversité microbienne dans les sols témoins (sans apport de résidus) a montré que les communautés (indice de diversité, structure et composition des communautés de bactéries et de champignons) étaient stables, malgré les variations climatiques saisonnières qui ont eu lieu sur le dispositif expérimental. Ces résultats sont originaux puisqu'il existe très peu de travaux dans la littérature sur la dynamique saisonnière





des communautés microbiennes du sol. Ils suggèrent que hors événements climatiques extrêmes, et sans couvert végétal, les communautés microbiennes sont stables dans le temps.

L'incorporation au sol de résidus de blé a impacté fortement la diversité des communautés microbiennes. A une échelle « globale » de mesure de la diversité des communautés (i.e. richesse et evenness), nous n'avons pas observé d'influence de l'historique cultural sur cette réponse. Pour les bactéries comme pour les champignons les modifications de diversité observées à cette échelle traduisent dans un premier temps la stimulation de populations opportunistes (r-stratégues) par les composés les plus facilement assimilables du blé, comme l'indique la baisse d'evenness suite à l'apport. L'analyse simultanée de la dynamique des communautés de bactéries et de champignons a montré que les champignons répondaient aussi rapidement que les bactéries à l'apport de matière organique fraîche. Ces résultats sont contraires à l'idée selon laquelle les différences physiologiques et cataboliques entre les bactéries et les champignons donneraient l'avantage aux bactéries pour dominer la première phase de décomposition d'un résidu (Romaní *et al.*, 2006; Poll *et al.*, 2008). Toutefois, la résilience plus lente observée pour les champignons pourrait illustrer l'aptitude de ces organismes à décomposer les composés les plus récalcitrants de la MOS, par comparaison avec les bactéries plus orientées vers la décomposition des composés facilement dégradables (de Boer *et al.*, 2005).

A une échelle plus fine d'analyse de la diversité microbienne (i.e. composition taxonomique), l'historique cultural a eu un impact sur la composition des successions de populations induites par l'apport de blé. En effet, si certains groupes microbiens ont été stimulés dans les deux sols (prairie vs. culture), d'autres ont été stimulés différenciellement entre les deux sols. L'analyse des attributs écologiques de ces populations apporte des éléments d'explication de leur réponse différentielle en fonction de l'historique cultural. De plus, elle suggère que la régulation de la composition des successions microbiennes par l'historique cultural pourrait avoir des répercussions en termes de santé des plantes et de transformation de la matière organique du sol. Parmi les groupes microbiens spécifiquement stimulés, nous avons par exemple identifié des espèces appartenant au genre *Burkholderia* ou *Fusarium*, tous deux reconnus pour leur implication dans la décomposition de la matière organique du sol, mais aussi pour leur impact sur la santé des plantes (Suárez-Moreno *et al.*, 2012; Silvestro *et al.*, 2013).

En conclusion, les résultats de ce travail apportent de nouvelles connaissances sur:



- la dynamique saisonnière de la diversité des communautés de bactéries et de champignons du sol,
- la réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus végétaux. L'analyse en parallèle des bactéries et de champignons apporte des informations sur l'implication relative de chacune des deux communautés dans les différentes phases de la décomposition des résidus.
- l'impact de l'historique cultural sur la régulation de la dynamique de la diversité et de la composition taxonomique des communautés de bactéries et de champignons en réponse à l'apport de résidus végétaux. Concernant ce dernier point, nos résultats ouvrent des perspectives importantes en termes d'impact potentiel des différences de composition des successions microbiennes observées sur le fonctionnement et la qualité sanitaire des sols.

## **2.4- Conclusion générale**

Dans un contexte scientifique, nos résultats montrent qu'au même titre que la diversité des communautés de végétaux, la diversité des communautés microbiennes du sol (bactéries et champignons) joue un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes. Dans ces travaux, nous avons vu que la diversité microbienne peut (i) représenter une « assurance » pour le maintien des fonctions essentielles du sol suite à des perturbations, et (ii) avoir une contribution forte dans les activités de transformation des matières organiques du sol. D'un point de vue plus appliqué, ces résultats soulignent la nécessité de préserver et de gérer la diversité microbienne du sol non seulement pour son intérêt patrimonial, mais aussi pour son implication dans les fonctions à la base de nombre de services rendus par le sol. La démonstration du rôle de la diversité dans les transformations de la MOS pose la question de l'intérêt que pourrait représenter l'intégration de paramètres de diversité microbienne (richesse, evenness, composition) dans les modèles de flux de matières et d'énergie (cycle du carbone, de l'azote, etc.).

Dans un contexte agronomique, nos résultats mettent en évidence que les pratiques agricoles, présentes ou passées, sont des drivers importants dans la modulation de la diversité microbienne (augmentation ou diminution). Un élément remarquable est la démonstration que l'utilisation agricole des sols n'est pas nécessairement associée à une baisse de la diversité des communautés microbiennes telluriques. Par conséquent, nos résultats suggèrent que le choix des pratiques par les agriculteurs peut avoir une influence importante sur le turnover de la matière organique du sol et donc sur la productivité et la durabilité des systèmes agricoles.



### 3- Perspectives

Les résultats de ce travail de thèse mettent en évidence une relation positive entre la diversité, la stabilité et l'activité des communautés microbiennes (en termes de transformation de la MOS). Ils suggèrent que les différents paramètres de diversité que nous avons testés (richesse, evenness, composition) pourraient donc constituer des indicateurs pertinents pour évaluer le fonctionnement biologique des sols et les services écosystémiques associés. Toutefois, pour conforter et définir la généralité de ces conclusions, d'autres travaux apparaissent nécessaires.

#### 3.1- Tester la généralité du lien diversité-fonctionnement

Dans nos travaux, l'analyse des relations entre la diversité microbienne, la stabilité et les activités liées au cycle du carbone s'est limitée à un faible nombre de sols. Or, il est maintenant reconnu que les propriétés physico-chimiques des sols ont une influence importante sur la diversité et l'activité des communautés microbiennes du sol (Ranjard *et al.*, 2010). Dans ce contexte, une première perspective de ces travaux serait d'examiner cette relation en prenant en compte une large gamme de sols représentative de la variabilité pédoclimatique et des modes d'usage (e.g à l'échelle d'un paysage, d'une région, d'un pays, etc.). Pour cela, l'approche en microcosmes de sol mise en œuvre dans le chapitre 3 consistant à coupler des outils d'écologie fonctionnelle (mesure d'émissions de CO<sub>2</sub> suite à un apport de résidus végétal marqué au <sup>13</sup>C) avec des outils d'écologie moléculaire (analyse de la diversité des communautés par séquençage massif des gènes ribosomiques) apparaît prometteuse. Elle permettrait (i) de tester la généralité du lien diversité/décomposition de la MOS, (ii) d'affiner l'estimation de la part relative de la diversité microbienne par rapport aux autres paramètres du milieu (propriétés physicochimiques, climat, mode d'usage,...) dans l'explication de l'intensité des flux de C dans le sol, et (iii), d'identifier et hiérarchiser les paramètres de diversité microbienne les plus explicatifs des flux de C dans le sol. Une autre perspective serait également d'utiliser cette approche pour tester d'autres activités microbiennes impliquées dans le fonctionnement biologique du sol (e.g. cycle des nutriments, structure du sol, etc.).

Dans le chapitre 2, nous avons mis en évidence l'existence de seuils de perte de diversité à partir desquels la stabilité structurale et fonctionnelle des communautés en réponse à une perturbation du milieu est affectée. Nos résultats montrent aussi que ces seuils dépendent de la perturbation appliquée. Cette notion de seuil nous apparaît importante car elle



suggère que la gestion durable de la diversité et de l'activité des communautés microbiennes du sol implique le maintien d'un niveau de diversité minimal des communautés. Toutefois, comme évoqué précédemment, cette démonstration n'a été faite que dans un seul type de sol et pour un nombre de perturbations limité. Il serait donc intéressant d'une part d'évaluer si ces seuils varient en fonction du type de sol et donc de la composition initiale de la communauté pour une perturbation donnée, et d'autre part de prendre en compte d'autres types de perturbations comme celles intervenant fréquemment dans les sols cultivés (travail du sol, traitements phytosanitaires, stress hydrique pour les changements climatiques...).

### **3.2- Valider la relation diversité microbienne - cycle du carbone au terrain**

Dans cette thèse, les travaux dédiés à l'étude du lien entre la diversité et la stabilité/activité des communautés microbiennes ont été réalisés dans des conditions contrôlées au laboratoire (chapitres 2 et 3). Une des perspectives de ces travaux serait de transposer ces résultats sur le terrain afin d'appréhender l'influence de la variabilité saisonnière des conditions climatiques sur cette relation. Cette perspective nécessite la mise en place de sites expérimentaux spécifiquement dédiés, sur lesquels la dynamique saisonnière de la diversité peut être mesurée en parallèle de celle de l'activité des communautés microbiennes.

Dans le quatrième chapitre de cette thèse, nous avons mis en place une expérimentation de ce type afin d'évaluer *in situ* l'influence de l'historique cultural du sol (prairie vs. culture) sur la diversité des communautés microbiennes et leur réponse dynamique à un apport de résidu de paille de blé. Dans le cadre de cette expérimentation, les variations saisonnières de l'activité des communautés microbiennes ont également été mesurées par un suivi du CO<sub>2</sub> émis dans chaque parcelle (prairie et culture). Dans ce travail, l'utilisation, comme pour le chapitre 3, de résidus de blé marqués au <sup>13</sup>C permet de distinguer le CO<sub>2</sub> issu de la minéralisation des résidus de blé de celui issu de la minéralisation de la matière organique indigène du sol (non marqué).

Pour résumé, les résultats préliminaires obtenus montrent que l'historique cultural et les variations saisonnières des conditions pédoclimatiques ont une influence importante sur les activités de minéralisation de la MOS. Nos résultats confirment également l'importance de certains paramètres abiotiques (température, azote minéral) et biotiques (biomasse, diversité) dans l'intensité des activités de minéralisation mesurée sur le terrain. D'autre part, ils montrent que la composition des communautés microbiennes (influencée par l'historique





cultural) est un paramètre important dans les processus de transformation de la matière organique, et peut dans notre cas, expliquer les différences de minéralisation observées entre nos deux sols. Toutefois, il convient d'approfondir ces résultats par d'autres analyses statistiques (e.g. partition de variance) afin d'apprécier la contribution relative de ces paramètres biotiques dans l'intensité des activités.

### **3.3- Evaluer la relation diversité-cycle du carbone en intégrant d'autres niveaux trophiques.**

Dans ces travaux de thèse, nous avons choisi d'étudier les communautés microbiennes du sol (bactéries et champignons) et l'influence de leur diversité sur les activités liées au cycle du carbone. Il y a maintenant un intérêt fondamental à avoir une vue plus holistique de la chaîne trophique et d'élargir l'analyse de la relation diversité-cycle du carbone à d'autres groupes d'organismes du sol. Dans la littérature, de nombreux travaux ont montré que la faune du sol (e.g. collemboles, acariens, nématodes, enchytrées, isopodes et vers de terres) et leurs interactions avec les microorganismes du sol, stimulaient la décomposition de la matière organique (Heemsbergen *et al.*, 2004; Cole *et al.*, 2006; Wall *et al.*, 2008). Par conséquent, la diversité de ces groupes d'organismes pourrait également avoir un rôle important en agissant directement ou indirectement sur les activités liées à la transformation de la MOS.

A ce jour, très peu de travaux ont évalué l'influence de la diversité sur le cycle du carbone en prenant en compte plusieurs niveaux trophiques (Nielsen *et al.*, 2011). Les quelques études examinant cet aspect se sont limitées à un faible nombre de groupe d'organismes (4 maximum) et par une caractérisation sommaire, voire inexistante, de la diversité des communautés microbiennes (Laakso & Setälä, 1999; Griffiths *et al.*, 2000, 2001; Heemsbergen *et al.*, 2004). Il serait donc intéressant d'évaluer par de nouvelles approches expérimentales l'influence de la diversité des espèces en prenant en compte l'ensemble des niveaux trophiques du sol.

### **3.4- Améliorer nos connaissances sur les mécanismes du « Priming effect »**

La compréhension des processus qui contrôlent l'accumulation du carbone dans les sols ou son émission dans l'atmosphère représente un enjeu important. Un des processus pouvant jouer sur cet équilibre est le « Priming effect », qui décrit la sur-minéralisation de la matière organique du sol induite par un apport de matière organique « fraîche » (Bingeman *et al.*, 1953; Fontaine *et al.*, 2004). Dans nos travaux, nous n'avons pas observé de relation entre



les paramètres de diversité pris en compte dans notre analyse (richesse et evenness) et le « Priming Effect » [Chapitre 3]. Cependant et en accord avec d'autres études (Garcia-Pausas & Paterson, 2011; Pascault *et al.*, 2013), nos résultats suggèrent que la composition des communautés microbiennes pourrait être un paramètre déterminant l'intensité et le sens du PE (positif ou négatif). Pour valider cette hypothèse, il serait nécessaire de conduire d'autres expérimentations afin de tester l'existence d'une relation entre la composition et le PE. Celles-ci pourraient se réaliser en utilisant l'approche par transplant qui a déjà été validée dans plusieurs travaux (Reed & Martiny, 2007; Strickland *et al.*, 2009; Cleveland *et al.*, 2014) et qui permet de manipuler spécifiquement la composition des communautés microbiennes du sol.

### **3.5- Perspectives finalisées**

D'un point de vue plus finalisé, les différentes perspectives présentées ci-dessus peuvent avoir comme résultantes :

- 1- d'établir des bioindicateurs robustes de l'état biologique des sols et de leurs gammes de variations, en fonction des différents paramètres environnementaux et des activités humaines.
- 2- d'intégrer les paramètres de la composante biotique du sol dans les modèles de prédiction de la minéralisation de la MOS, afin d'améliorer nos prédictions et la gestion des flux de carbone entre les différents compartiments des écosystèmes.
- 3- de définir des systèmes agricoles les plus adaptés pour gérer la diversité microbienne et ainsi apporter des outils d'aide à la décision pour les agriculteurs sur le choix des pratiques.
- 4- de définir des seuils d'alerte de la diversité en dessous desquels l'activité des communautés microbiennes et donc le fonctionnement biologique du sol ne seraient pas maintenus.



## REFERENCES

- Acosta-Martínez V, Dowd S, Sun Y, Allen V. (2008). Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biol Biochem* **40**:2762–2770.
- Acosta-Martínez V, Dowd SE, Bell CW, Lascano R, Booker JD, Zobeck TM, *et al.* (2010). Microbial community composition as affected by dryland cropping systems and tillage in a semiarid sandy soil. *Diversity* **2**:910–931.
- Akerblom S, Bringmark L, Nilsson M. (2010). Organic matter control of mercury and lead toxicity in mor layers. *Ecotoxicol Environ Saf* **73**:924–931.
- Allison SD, Martiny JBH. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *P Natl Acad Sci USA* **105**:11512–11519.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**:143–169.
- Anderson IC, Campbell CD, Prosser JI. (2003). Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environ Microbiol* **5**:36–47.
- Aneja MK, Sharma S, Fleischmann F, Stich S, Heller W, Bahnweg G, *et al.* (2006). Microbial colonization of beech and spruce litter-influence of decomposition site and plant litter species on the diversity of microbial community. *Microb Ecol* **52**:127–135.
- Arrouays D, Balesdent J, Germon JC, Jayet PA, Soussana JF, Stengel P. (2002). Contribution à la lutte contre l'effet de serre. Stocker du carbone dans les sols agricoles de France? *Expertise scientifique collective*.
- Attard E, Recous S, Chabbi A, De Berranger C, Guillaumaud N, Labreuche J, *et al.* (2011). Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Glob Chang Biol* **17**:1975–1989.
- Azmal AKM, Marumoto T, Shindo H, Nishiyama M. (1997). Changes in microbial biomass after continuous application of azolla and rice straw in soil. *Soil Sci Plant Nutr* **43**:811–818.
- Baldrian P. (2008). Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecol* **1**:4–12.
- Balvanera P, Pfisterer AB, Buchmann N, He J-S, Nakashizuka T, Raffaelli D, *et al.* (2006). Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecol Lett* **9**:1146–1156.
- Banning NC, Murphy DV. (2008). Effect of heat-induced disturbance on microbial biomass and activity in forest soil and the relationship between disturbance effects and microbial community structure. *Appl Soil Ecol* **40**:109–119.
- Bárcenas-Moreno G, Bååth E. (2009). Bacterial and fungal growth in soil heated at different temperatures to simulate a range of fire intensities. *Soil Biol Biochem* **41**:2517–2526.



- Bardgett RD, Leemans D. (1996). Soil microbial activity on exposed mountain ridges in snowdonia (Eryri), North Wales. *Soil Biol Biochem* **28**:1533–1536.
- Bardgett RD, McAlister E. (1999). The measurement of soil fungal:bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biol Fertil Soils* **29**:282–290.
- Bardgett RD, Freeman C, Ostle NJ. (2008). Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *ISME J* **2**:805–814.
- Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, Wogan GOU, Swartz B, Quental TB, *et al.* (2011). Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* **471**:51–7.
- Barns SM, Takala SL, Kuske CR. (1999). Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Appl Environ Microb* **65**:1731-1737.
- Barrios E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecol Econ* **64**:269–285.
- Bastian F, Bouziri L, Nicolardot B, Ranjard L. (2009). Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biol Biochem* **41**:262–275.
- Baumann K, Marschner P, Smernik RJ, Baldock JA. (2009). Residue chemistry and microbial community structure during decomposition of eucalypt, wheat and vetch residues. *Soil Biol Biochem* **41**:1966–1975.
- Baumann K, Dignac M-F, Rumpel C, Bardoux G, Sarr A, Steffens M, *et al.* (2012). Soil microbial diversity affects soil organic matter decomposition in a silty grassland soil. *Biogeochemistry* **114**:201–212.
- Beare MH, Coleman DC, Crossley DA, Hendrix PF, Odum EP. (1995). A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant Soil* **170**:5–22.
- Beare MH, Reddy MV, Tian G, Srivastava SC. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of decomposer biota. *Appl Soil Ecol* **6**:87–108.
- Bell JM, Smith JL, Bailey VL, Bolton H. (2003). Priming effect and C storage in semi-arid no-till spring crop rotations. *Biol Fertil Soils* **37**:237–244.
- Bell T, Newman J a, Silverman BW, Turner SL, Lilley AK. (2005). The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* **436**:1157–1160.
- Bending GD, Turner MK, Jones JE. (2002). Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* **34**:1073–1082.
- Bending GD, Turner MK, Rayns F, Marx M-C, Wood M. (2004). Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biol Biochem* **36**:1785–1792.





- Bérard A, Bouchet T, Sévenier G, Pablo AL, Gros R. (2011). Resilience of soil microbial communities impacted by severe drought and high temperature in the context of Mediterranean heat waves. *Eur J Soil Biol* **47**:333–342.
- Bernard L, Mougél C, Maron P-A, Nowak V, Lévêque J, Henault C, *et al.* (2007). Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from <sup>13</sup>C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environ Microbiol* **9**:752–764.
- Bernard L, Maron P-A, Mougél C, Nowak V, Lévêque J, Marol C, *et al.* (2009). Contamination of soil by copper affects the dynamics, diversity, and activity of soil bacterial communities involved in wheat decomposition and carbon storage. *Appl Environ Microbiol* **75**:7565–7569.
- Bingeman CW, Varner JE, Martin WP. (1953). The effect of the addition of organic materials on the decomposition of an organic soil. *Soil Sci Soc Am Proc* **17**:34–38.
- Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. (2013). Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biol Biochem* **67**:192–211.
- Blagodatskaya EV, Blagodatsky SA, Anderson T-H, Kuzyakov Y. (2007). Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. *Appl Soil Ecol* **37**:95–105.
- Blouin M, Hodson ME, Delgado EA, Baker G, Brussaard L, Butt KR, *et al.* (2013). A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *Eur J Soil Sci* **64**:161–182.
- De Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev* **29**:795–811.
- Bressan M, Mougél C, Dequiedt S, Maron P-A, Lemanceau P, Ranjard L. (2008). Response of soil bacterial community structure to successive perturbations of different types and intensities. *Environ Microbiol* **10**:2184–2187.
- Bruand A. (2009). Qu'est ce que le sol ? in *Le sol, Dossier INRA*, pp. 12–17.
- Brussaard L, de Ruiter PC, Brown GG. (2007). Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agric Ecosyst Environ* **121**:233–244.
- Bucldey DH, Schmidt TM. (2001). The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microb Ecol* **42**:11–21.
- Buée M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, Uroz S, *et al.* (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol* **184**:449–456.
- Bünemann EK, Schwenke GD, Van Zwieten L. (2006). Impact of agricultural inputs on soil organisms—a review. *Aust J Soil Res* **44**:379.
- Caldwell BA. (2005). Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiologia* **49**:637–644.



- Campbell V, Murphy G, Romanuk TN. (2011). Experimental design and the outcome and interpretation of diversity-stability relations. *Oikos* **120**:399–408.
- Cardinale BJ, Duffy JE, Gonzalez A, Hooper DU, Perrings C, Venail P, *et al.* (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* **486**:59–67.
- De Castro AP, Quirino BF, Pappas G, Kurokawa AS, Neto EL, Krüger RH. (2008). Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. *Arch Microbiol* **190**:129–139.
- Chabbi A, Kögel-Knabner I, Rumpel C. (2009). Stabilised carbon in subsoil horizons is located in spatially distinct parts of the soil profile. *Soil Biol Biochem* **41**:256–261.
- Chaer G, Fernandes M, Myrold D, Bottomley P. (2009). Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. *Microb Ecol* **58**:414–24.
- Chaparro JM, Sheflin AM, Manter DK, Vivanco JM. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol Fertil Soils* **48**:489–499.
- Chapin FS, Zavaleta ES, Eviner VT, Naylor RL, Vitousek PM, Reynolds HL, *et al.* (2000). Consequences of changing biodiversity. *Nature* **405**:234–42.
- Chemidlin Prévost-Bouré N, Christen R, Dequiedt S, Mougel C, Lelièvre M, Jolivet C, *et al.* (2011). Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS One* **6**:e24166.
- Chen Y, Murrell JC. (2010). When metagenomics meets stable-isotope probing: progress and perspectives. *Trends Microbiol* **18**:157–63.
- Cleveland CC, Nemergut DR, Schmidt SK, Townsend AR. (2007). Increases in soil respiration following labile carbon additions linked to rapid shifts in soil microbial community composition. *Biogeochemistry* **82**:229–240.
- Cleveland CC, Reed SC, Keller AB, Nemergut DR, O'Neill SP, Ostertag R, *et al.* (2014). Litter quality versus soil microbial community controls over decomposition: a quantitative analysis. *Oecologia* **174**:283–94.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, *et al.* (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **37**:141–145.
- Cole L, Bradford MA, Shaw PJA, Bardgett RD. (2006). The abundance, richness and functional role of soil meso- and macrofauna in temperate grassland -A case study. *Appl Soil Ecol* **33**:186–198.
- Coleman DC, Whitman WB. (2005). Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. *Pedobiologia* **49**:479–497.
- Colman BP, Schimel JP. (2013). Drivers of microbial respiration and net N mineralization at the continental scale. *Soil Biol Biochem* **60**:65–76.



- Connell JH. (1978). Diversity in tropical rain forests and coral reefs high diversity of trees and corals is maintained. *Science* **199**:1302–1310.
- Cook RD, Weisberg S. (1999). Graphs in statistical analysis: is the medium the message? *Am Stat* **53**:29–37.
- Coppens F, Garnier P, De Gryze S, Merckx R, Recous S. (2006). Soil moisture, carbon and nitrogen dynamics following incorporation and surface application of labelled crop residues in soil columns. *Eur J Soil Sci* **57**:894–905.
- Crouzet O, Batisson I, Besse-Hoggan P, Bonnemoy F, Bardot C, Poly F, *et al.* (2010). Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. *Soil Biol Biochem* **42**:193–202.
- Curtis TP, Sloan WT. (2005). Exploring microbial diversity-a vast below. *Science* **309**:1331–1333.
- Daily GC, Alexander S, Ehrlich PR, Goulder L, Lubchenco J, Matson PA, *et al.* (1997). Ecosystem services: benefits supplied to human societies by natural ecosystems. *Issue Ecol* **2**:18–24.
- Dallimer M, Tinch D, Acs S, Hanley N, Southall HR, Gaston KJ, *et al.* (2009). 100 Years of change: examining agricultural trends, habitat change and stakeholder perceptions through the 20th Century. *J Appl Ecol* **46**:334–343.
- Davidson EA, Janssens IA. (2006). Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature* **440**:165–173.
- Davis KER, Sangwan P, Janssen PH. (2011). *Acidobacteria*, *Rubrobacteridae* and *Chloroflexi* are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. *Environ Microbiol* **13**:798–805.
- Deacon JW. (2006). *Fungal Biology* 4<sup>th</sup> edition. Blackwell Publishing. 380p.
- DeBruyn JM, Nixon LT, Fawaz MN, Johnson AM, Radosevich M. (2011). Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. *Appl Environ Microbiol* **77**:6295–300.
- Degens BP. (1998). Decreases in microbial functional diversity do not result in corresponding changes in decomposition under different moisture conditions. *Soil Biol Biochem* **30**:1989–2000.
- Degens BP, Schipper LA, Sparling GP, Duncan LC. (2001). Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biol Biochem* **33**:1143–1153.
- Deng H. (2012). A review of diversity-stability relationship of soil microbial community: What do we not know? *J Environ Sci* **24**:1027–1035.
- Dequiedt S, Saby NPA, Lelievre M, Jolivet C, Thioulouse J, Toutain B, *et al.* (2011). Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Glob Ecol Biogeogr* **20**:641–652.



- De Deyn GB, Quirk H, Oakley S, Ostle N, Bardgett RD. (2011). Rapid transfer of photosynthetic carbon through the plant-soil system in differently managed species-rich grasslands. *Biogeosciences* **8**:1131–1139.
- Dimitriu PA, Lee D, Grayston SJ. (2010). An evaluation of the functional significance of peat microorganisms using a reciprocal transplant approach. *Soil Biol Biochem* **42**:65–71.
- Drenovsky RE, Steenwerth KL, Jackson LE, Scow KM. (2010). Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. *Glob Ecol Biogeogr* **19**:27–39.
- Eida MF, Nagaoka T, Wasaki J, Kouno K. (2011). Evaluation of cellulolytic and hemicellulolytic abilities of fungi isolated from coffee residue and sawdust composts. *Microbes Environ* **26**:220–227.
- Ettema CH, Wardle DA. (2002). Spatial soil ecology. **17**:177–183.
- Falchini L, Naumova N, Kuikman PJ, Bloem J, Nannipieri P. (2003). CO<sub>2</sub> evolution and denaturing gradient gel electrophoresis profiles of bacterial communities in soil following addition of low molecular weight substrates to simulate root exudation. *Soil Biol Biochem* **35**:775–782.
- Fang C, Smith P, Smith JU, Moncrieff JB. (2005). Incorporating microorganisms as decomposers into models to simulate soil organic matter decomposition. *Geoderma* **129**:139–146.
- Fierer N, Jackson RB. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:626–631.
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* **88**:1354–1364.
- Fierer N, Breitbart M, Nulton J, Salamon P, Lozupone C, Jones R, *et al.* (2007). Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Appl Environ Microbiol* **73**:7059–66.
- Fierer N, Strickland MS, Liptzin D, Bradford MA, Cleveland CC. (2009). Global patterns in belowground communities. *Ecol Lett* **12**:1238–49.
- Fisher B, Turner RK, Morling P. (2009). Defining and classifying ecosystem services for decision making. *Ecol Econ* **68**:643–653.
- Fontaine S, Bardoux G, Abbadie L, Mariotti A. (2004). Carbon input to soil may decrease soil carbon content. *Ecol Lett* **7**:314–320.
- Fontaine S, Mariotti A, Abbadie L. (2003). The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biol Biochem* **35**:837–843.
- Fontaine S, Barot S. (2005). Size and functional diversity of microbe populations control plant persistence and long-term soil carbon accumulation. *Ecol Lett* **8**:1075–1087.
- Fontaine S, Henault C, Aamor A, Bdioui N, Bloor JMG, Maire V, *et al.* (2011). Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biol Biochem* **43**:86–96.





- Franklin RB, Garland JAYL, Bolster CH, Mills AL. (2001). Impact of dilution on microbial community structure and functional potential: comparison of numerical simulations and batch culture experiments. *Appl Environ Microbiol* **67**:702–712.
- Freeman C, Kim S-Y, Lee S-H, Kang H. (2004). Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations on soil microorganisms. *J Microbiol* **42**:267–277.
- Frey S, Elliott E, Paustian K. (1999). Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and no-tillage agroecosystems along two climatic gradients. *Soil Biol Biochem* **31**:573–585.
- Fulthorpe RR, Roesch LFW, Riva A, Triplett EW. (2008). Distantly sampled soils carry few species in common. *ISME J* **2**:901–10.
- Gaillard V, Chenu C, Recous S, Richard G. (1999). Carbon , nitrogen and microbial gradients induced by plant residues decomposing in soil. *Eur J Soil Sci* **50**:567–578.
- Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* **309**:1387–90.
- Garcia-Pausas J, Paterson E. (2011). Microbial community abundance and structure are determinants of soil organic matter mineralisation in the presence of labile carbon. *Soil Biol Biochem* **43**:1705–1713.
- Garland J, Lehman R. (1999). Dilution/extinction of community phenotypic characters to estimate relative structural diversity in mixed communities. *FEMS Microbiol Ecol* **30**:333–343.
- Garland JL, Mills AL. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol* **57**:2351–2359.
- Gignoux J, House J, Hall D, Masse D, Nacro HB, Abbadie LUC, *et al.* (2001). Design and test of a generic cohort model of soil organic matter decomposition: the SOMKO model. 639–660.
- Giller KE, Beare MH, Lavelle P, Izac AN, Swift MJ. (1997). Agricultural intensification , soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl Soil Ecol* **6**:3–16.
- Giller KE, Witter E, Mcgrath SP. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* **30**:1389–1414.
- Girard MC, Walter C, Rémy JC, Berthelin J, Morel JL. (2005). Sols et environnements.
- Girvan MS, Bullimore J, Ball AS, Pretty JN, Osborn AM. (2004). Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Appl Environ Microbiol* **70**:2692–2701.
- Girvan MS, Campbell CD, Killham K, Prosser JI, Glover LA. (2005). Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ Microbiol* **7**:301–313.



- Gobat JM, Aragno M, Mathhey W. (1998). Le sol vivant. Collection "Gérer l'environnement" 14, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 519p.
- Gonzales-Quiñones V, Stockdale EA, Banning NC, Hoyle FC, Sawada Y, Wherrett AD, *et al.* (2011). Soil microbial biomass - Interpretation and consideration for soil monitoring. *Soil Res* **49**:287–304.
- Gordon H, Haygarth PM, Bardgett RD. (2008). Drying and rewetting effects on soil microbial community composition and nutrient leaching. *Soil Biol Biochem* **40**:302–311.
- Gregory AS, Watts CW, Griffiths BS, Hallett PD, Kuan HL, Whitmore AP. (2009). The effect of long-term soil management on the physical and biological resilience of a range of arable and grassland soils in England. *Geoderma* **153**:172–185.
- Griffiths BS, Ritz K, Bardgett RD, Cook R, Christensen S, Ekelund F, *et al.* (2000). Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity – ecosystem function relationship. *Oikos* **2**:279–294.
- Griffiths BS, Ritz K, Wheatley R, Kuan HL, Boag B, Christensen S, *et al.* (2001a). An examination of the biodiversity ± ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* **33**:1713–1722.
- Griffiths BS, Bonkowski M, Roy J, Ritz K. (2001b). Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Appl Soil Ecol* **16**:49–61.
- Griffiths BS, Hallett PD, Kuan HL, Gregory AS, Watts CW, Whitmore AP. (2008). Functional resilience of soil microbial communities depends on both soil structure and microbial community composition. *Biol Fertil Soils* **44**:745–754.
- Griffiths BS, Kuan HL, Ritz K, Glover LA, McCaig AE, Fenwick C. (2004). The relationship between microbial community structure and functional stability, tested experimentally in an upland pasture soil. *Microb Ecol* **47**:104–113.
- Griffiths BS, Philippot L. (2013). Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol Rev* **37**:112–129.
- Grigal DF. (2003). Mercury sequestration in forests and peatlands: a review. *J Environ Qual* **32**:393–405.
- Grime JP. (1997). The humped-back model: a response to Oksanen. *J Ecol* **85**:97–98.
- Guenet B, Lenhart K, Leloup J, Giusti-Miller S, Pouteau V, Mora P, *et al.* (2012). The impact of long-term CO<sub>2</sub> enrichment and moisture levels on soil microbial community structure and enzyme activities. *Geoderma* **170**:331–336.
- Hamdi S, Chevallier T, Ben Aïssa N, Ben Hammouda M, Gallali T, Chotte J-L, *et al.* (2011). Short-term temperature dependence of heterotrophic soil respiration after one-month of pre-incubation at different temperatures. *Soil Biol Biochem* **43**:1752–1758.
- Hannula SE, Boschker HTS, de Boer W, van Veen JA. (2012). <sup>13</sup>C pulse-labeling assessment of the community structure of active fungi in the rhizosphere of a genetically starch-



- modified potato (*Solanum tuberosum*) cultivar and its parental isoline. *New Phytol* **194**:784–799.
- Harris-Hellal J, Vallaeys T, Garnier-Zarli E, Bousserhine N. (2009). Effects of mercury on soil microbial communities in tropical soils of French Guyana. *Appl Soil Ecol* **41**:59–68.
- Hayatsu M, Tago K, Saito M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci Plant Nutr* **54**:33–45.
- Hayden HL, Mele PM, Bougoure DS, Allan CY, Norng S, Piceno YM, *et al.* (2012). Changes in the microbial community structure of bacteria, archaea and fungi in response to elevated CO<sub>2</sub> and warming in an Australian native grassland soil. *Environ Microbiol* **14**:3081–3096.
- Heemsbergen DA, Berg MP, Loreau M, van Hal JR, Faber JH, Verhoef HA. (2004). Biodiversity effects on soil processes explained by interspecific functional dissimilarity. *Science* **306**:1019–1020.
- Heimann M, Reichstein M. (2008). Terrestrial ecosystem carbon dynamics and climate feedbacks. *Nature* **451**:289–292.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JP. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature* **394**:431.
- Henriksen TM, Breland TA. (1999). Evaluation of criteria for describing crop residue degradability in a model of carbon and nitrogen turnover in soil. *Soil Biol Biochem* **31**:1135–1149.
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM. (1997). Analysis of *Actinomycete* communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* **63**:3233–3241.
- Hooper DU, Adair EC, Cardinale BJ, Byrnes JEK, Hungate BA, Matulich KL, *et al.* (2012). A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature* **486**:105–108.
- Horz H-P, Barbrook A, Field CB, Bohannon BJM. (2004). Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:15136–15141.
- Hu S, van Bruggen AHC. (1997). Microbial dynamics associated with multiphasic decomposition of <sup>14</sup>C-labeled cellulose in Soil. *Microb Ecol* **33**:134–143.
- Jangid K, Williams MA, Franzluebbers AJ, Sanderlin JS, Reeves JH, Jenkins MB, *et al.* (2008). Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biol Biochem* **40**:2843–2853.
- Jangid K, Williams MA, Franzluebbers AJ, Schmidt TM, Coleman DC, Whitman WB. (2011). Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. *Soil Biol Biochem* **43**:2184–2193.



- Jenkins SN, Rushton SP, Lanyon C V., Whiteley AS, Waite IS, Brookes PC, *et al.* (2010). Taxon-specific responses of soil bacteria to the addition of low level C inputs. *Soil Biol Biochem* **42**:1624–1631.
- Jenkinson DS. (1966). Studies on the decomposition of plant material in soil. *J Soil Sci* **17**:280–302.
- Jenkinson DS, Brookes PC, Powlson DS. (2004). Measuring soil microbial biomass. *Soil Biol Biochem* **36**:5–7.
- Jones RT, Robeson MS, Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. (2009). A comprehensive survey of soil *acidobacterial* diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME J* **3**:442–453.
- Kim M, Kim W-S, Tripathi BM, Adams J. (2014). Distinct bacterial communities dominate tropical and temperate zone leaf litter. *Microb Ecol* **67**:837–848.
- Kirschbaum M. (2006). The temperature dependence of organic-matter decomposition—still a topic of debate. *Soil Biol Biochem* **38**:2510–2518.
- Klaubauf S, Inselsbacher E, Zechmeister-Boltenstern S, Wanek W, Gottsberger R, Strauss J, *et al.* (2010). Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from Lower Austria. *Fungal Divers* **44**:65–75.
- Kuan HL, Fenwick C, Glover LA, Griffiths BS, Ritz K. (2006). Functional resilience of microbial communities from perturbed upland grassland soils to further persistent or transient stresses. *Soil Biol Biochem* **38**:2300–2306.
- Kumar R, Sinha A, Srivastava S, Srivastava M. (2011). Variation in soil mycobiota associated with decomposition of *sesbania aculeata* L. *Asian J PLant Pathol* **5**:37–45.
- Kuramae EE, Yergeau E, Wong LC, Pijl AS, van Veen JA, Kowalchuk GA. (2012). Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiol Ecol* **79**:12–24.
- Kuzyakov Y, Friedel JK, Stahr K. (2000). Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol Biochem* **32**:1485–1498.
- Laakso J, Setälä H. (1999). Sensitivity of primary production to changes in the architecture of belowground food webs. *oikos* **87**:57–64.
- Lagomarsino A, Benedetti A, Marinari S, Pompili L, Moscatelli MC, Roggero PP, *et al.* (2011). Soil organic C variability and microbial functions in a Mediterranean agro-forest ecosystem. *Biol Fertil Soils* **47**:283–291.
- Landi L, Valori F, Ascher J, Renella G, Falchini L, Nannipieri P. (2006). Root exudate effects on the bacterial communities, CO<sub>2</sub> evolution, nitrogen transformations and ATP content of rhizosphere and bulk soils. *Soil Biol Biochem* **38**:509–516.
- Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol Biochem* **40**:2407–2415.





- Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* **75**:5111–5120.
- Lauber CL, Ramirez KS, Aanderud Z, Lennon J, Fierer N. (2013). Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME J* **7**:1641–1650.
- Lavelle P, Decaëns T, Aubert M, Barot S, Blouin M, Bureau F, *et al.* (2006). Soil invertebrates and ecosystem services. *Eur J Soil Biol* **42**:3–15.
- Lawes JB, Gilbert JH, Master M. (1882). Agricultural, chemical, and botanical results of experiments on the mixed herbage of permanent grasslands, conducted for more than twenty years in succession on the same land. *Philos Trans R Soc L* **173**:1181–1423.
- Leckie SE, Prescott CE, Grayston SJ, Neufeld JD, Mohn WW. (2004). Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biol Biochem* **36**:529–532.
- Le Guillou C, Angers DA, Maron P-A, Leterme P, Menasseri-Aubry S. (2012). Linking microbial community to soil water-stable aggregation during crop residue decomposition. *Soil Biol Biochem* **50**:126–133.
- Lejon DPH, Pascault N, Ranjard L. (2010). Differential copper impact on density, diversity and resistance of adapted culturable bacterial populations according to soil organic status. *Eur J Soil Biol* **46**:168–174.
- Liebich J, Vereecken H, Buraue P. (2006). Microbial community changes during humification of <sup>14</sup>C-labelled maize straw in heat-treated and native Orthic Luvisol. *Eur J Soil Sci* **57**:446–455.
- Liebich J, Schlöter M, Schäffer A, Vereecken H, Buraue P. (2007). Degradation and humification of maize straw in soil microcosms inoculated with simple and complex microbial communities. *Eur J Soil Sci* **58**:141–151.
- Lienhard P, Terrat S, Prévost-Bouré NC, Nowak V, Régnier T, Sayphoummie S, *et al.* (2013). Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland. *Agron Sustain Dev* **34**:525–533.
- Loreau M, Hector A. (2001). Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* **412**:72–76.
- Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsson J, Grime JP, Hector A, *et al.* (2001). Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science* **294**:804–808.
- Loreau M. (2004). Does functional redundancy exist? *Oikos* **3**:607–611.
- Lozupone C, Knight R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **71**:8228–8235.
- Lundquist E, Jackson L, Scow K, Hsu C. (1999). Changes in microbial biomass and community composition, and soil carbon and nitrogen pools after incorporation of rye into three California agricultural soils. *Soil Biol Biochem* **31**:221–236.



- Lützow M, Kögel-Knabner I. (2009). Temperature sensitivity of soil organic matter decomposition—what do we know ? *Biol Fertil Soils* **46**:1–15.
- Lynch JM, Benedetti A, Insam H, Nuti MP, Smalla K, Torsvik V, *et al.* (2004). Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biol Fertil Soils* **40**:363–385.
- MacArthur RH, Wilson EO. (1967). The theory of islands biogeography. Princeton.
- Millennium Ecosystem Assessment. (2005). Ecosystem and Human Well-Being: Synthesis. Island press, Washington, DC.
- Mandic-mulec I, Prosser JI. (2011). Diversity of Endospore-forming bacteria in soil: characterization and driving mechanisms. In *Endospore-forming Soil Bacteria*, Soil Biology **27**: 31-59, Springer Berlin Heidelberg.
- Manlay RJ, Feller C, Swift MJ. (2007). Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping systems. *Agric Ecosyst Environ* **119**:217–233.
- Maron P-A, Ranjard L, Mougél C, Lemanceau P. (2007). Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. *Microb Ecol* **53**:486–93.
- Maron P-A, Mougél C, Ranjard L. (2011). Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *C R Biol* **334**:403–411.
- Marschner P, Umar S, Baumann K. (2011). The microbial community composition changes rapidly in the early stages of decomposition of wheat residue. *Soil Biol Biochem* **43**:445–451.
- Marstorp H, Guan X, Gong P. (2000). Relationship between dsDNA , chloroform labile C and ergosterol in soils of different organic matter contents and pH. *Soil Biol Biochem* **32**:879–882.
- Martens R. (1995). Current methods for measuring microbial biomass C in soil: Potentials and limitations. *Biol Fertil Soils* **19**:87–99.
- Martin SL, Mooney SJ, Dickinson MJ, West HM. (2012). Soil structural responses to alterations in soil microbiota induced by the dilution method and mycorrhizal fungal inoculation. *Pedobiologia* **55**:271–281.
- McIntosh RP, Odum EP. (1969). Ecological succession. *Science* **166**:403–404.
- McLauchlan K. (2006). The nature and longevity of agricultural impacts on soil carbon and nutrients: a review. *Ecosystems* **9**:1364–1382.
- McMahon SK, Williams MA, Bottomley PJ, Myrold DD. (2005). Dynamics of microbial communities during decomposition of carbon-13 labeled ryegrass fractions in soil. *Soil Sci Soc Am J* **69**:1238-1247.
- Meidute S, Demoling F, Bååth E. (2008). Antagonistic and synergistic effects of fungal and bacterial growth in soil after adding different carbon and nitrogen sources. *Soil Biol Biochem* **40**:2334–2343.



- Morris CE, Bardin M, Berge O, Fromin N, Girardin H, Lebaron P, *et al.* (2002). Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol Mol Biol R* **66**:592-616.
- Müller AK, Westergaard K, Christensen S, Sørensen SJ. (2001). The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* **36**:11–19.
- Müller AK, Westergaard K, Christensen S, Sørensen SJ. (2002). The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microb Ecol* **44**:49–58.
- Mummey D, Holben W, Six J, Stahl P. (2006). Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. *Microb Ecol* **51**:404–411.
- Nacke H, Thürmer A, Wollherr A, Will C, Hodac L, Herold N, *et al.* (2011). Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS One* **6**:e17000.
- Naeem S, Li S. (1997). Diversity enhances ecosystem reliability. *Nature* **390**:507–509.
- Naether A, Foessel BU, Naegele V, Wüst PK, Weinert J, Bonkowski M, *et al.* (2012). Environmental factors affect *Acidobacterial* communities below the subgroup level in grassland and forest soils. *Appl Environ Microbiol* **78**:7398–7406.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* **54**:655–670.
- Navarro-Noya YE, Gómez-Acata S, Montoya-Ciriaco N, Rojas-Valdez A, Suárez-Arriaga MC, Valenzuela-Encinas C, *et al.* (2013). Relative impacts of tillage, residue management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. *Soil Biol Biochem* **65**:86–95.
- Neill C, Gignoux J. (2006). Soil organic matter decomposition driven by microbial growth: A simple model for a complex network of interactions. *Soil Biol Biochem* **38**:803–811..
- Neufeld JD, Dumont MG, Vohra J, Murrell JC. (2007). Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microb Ecol* **53**:435–42.
- Nguyen C. (2003). Review article Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* **23**:375–396.
- Nicolardot B, Recous S, Mary B. (2001). Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: A simple dynamic model based on the C/N ratio of the residues. *Plant Soil* **228**:83–103.
- Nielsen UN, Ayres E, Wall DH, Bardgett RD. (2011). Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity-function relationships. *Eur J Soil Sci* **62**:105–116.
- Nocker A, Burr M, Camper AK. (2007). Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb Ecol* **54**:276–289.
- Ofek M, Hadar Y, Minz D. (2012). Ecology of root colonizing *Massilia* (*Oxalobacteraceae*). *PLoS One* **7**:e40117.



- Orgiazzi A, Lumini E, Nilsson RH, Girlanda M, Vizzini A, Bonfante P, *et al.* (2012). Unravelling soil fungal communities from different Mediterranean land-use backgrounds. *PLoS One* **7**:e34847.
- Orwin KH, Wardle DA. (2004). New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biol Biochem* **36**:1907–1912.
- Øvreås L, Torsvik V. (1998). Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb Ecol* **36**:303–315.
- Pace NR, Stahl DA, Lane DL, Olsen GJ. (1986). The analysis of natural microbial populations by rRNA sequences. *Adv Microb Ecol* **9**:1–55.
- Pascual N, Nicolardot B, Bastian F, Thiébeau P, Ranjard L, Maron P-A. (2010). *In situ* dynamics and spatial heterogeneity of soil bacterial communities under different crop residue management. *Microb Ecol* **60**:291–303.
- Pascual N, Ranjard L, Kaisermann A, Bachar D, Christen R, Terrat S, *et al.* (2013). Stimulation of different functional groups of bacteria by various plant residues as a driver of soil Priming effect. *Ecosystems* **16**:810-822.
- Paterson E, Osler G, Dawson LA, Gebbing T, Sim A, Ord B. (2008). Labile and recalcitrant plant fractions are utilised by distinct microbial communities in soil: Independent of the presence of roots and mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* **40**:1103–1113.
- Patra DD, Bhandari SC, Misra A. (1992). Effect of plant residues on the size of microbial biomass and nitrogen mineralization in soil: Incorporation of cowpea and wheat straw. *Soil Sci Plant Nutr* **38**:1–6.
- Petric I, Philippot L, Abbate C, Bispo A, Chesnot T, Hallin S, *et al.* (2011). Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 “Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples”. *J Microbiol Methods* **84**:454–460.
- Philippot L, Spor A, Hénault C, Bru D, Bizouard F, Jones CM, *et al.* (2013). Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME J* **7**:1609–1619.
- Plassart P, Akpa Venceslas M, Gangneux C, Mercier A, Barray S, Laval K. (2008). Molecular and functional responses of soil microbial communities under grassland restoration. *Agric Ecosyst Environ* **127**:286–293.
- Plassart P, Terrat S, Thomson B, Griffiths R, Dequiedt S, Lelievre M, *et al.* (2012). Evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure. *PLoS One* **7**:e44279.
- Poll C, Marhan S, Ingwersen J, Kandeler E. (2008). Dynamics of litter carbon turnover and microbial abundance in a rye detritusphere. *Soil Biol Biochem* **40**:1306–1321.
- Postma J, Schilder MT, van Hoof RA. (2011). Indigenous populations of three closely related *Lysobacter* spp. in agricultural soils using real-time PCR. *Microb Ecol* **62**:948–958.
- Ramette A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **62**:142–160.





- Ranjard L, Richaume A, Jocteur-Monrozier L, Nazaret S. (1997). Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiol Ecol* **24**:321–331.
- Ranjard L, Poly F, Nazaret S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res Microbiol* **151**:167–177.
- Ranjard L, Lejon DPH, Mougél C, Schehrer L, Merdinoglu D, Chaussod R. (2003). Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ Microbiol* **5**:1111–1120.
- Ranjard L, Echairi A, Nowak V, Lejon DPH, Nouaïm R, Chaussod R. (2006). Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural Cu treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. *FEMS Microbiol Ecol* **58**:303–315.
- Ranjard L, Lignier L, Chaussod R. (2006). Cumulative effects of short-term polymetal contamination on soil bacterial community structure. *Appl Environ Microbiol* **72**:1684–87.
- Ranjard L, Nowak V, Echairi A, Faloya V, Chaussod R. (2008). The dynamics of soil bacterial community structure in response to yearly repeated agricultural copper treatments. *Res Microbiol* **159**:251–254.
- Ranjard L, Dequiedt S, Jolivet C, Saby NP a., Thioulouse J, Harmand J, *et al.* (2010). Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing french national initiative. *Agron Sustain Dev* **30**:359–365.
- Ranjard L, Dequiedt S, Chemidlin Prévost-Bouré N, Thioulouse J, Saby NPA, Lelievre M, *et al.* (2013). Turnover of soil bacterial diversity driven by wide-scale environmental heterogeneity. *Nat Commun* **4**:1434.
- Rasmussen LD, Sørensen SJ. (2001). Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiol Ecol* **36**:1–9.
- Reed HE, Martiny JBH. (2007). Testing the functional significance of microbial composition in natural communities. *FEMS Microbiol Ecol* **62**:161–170.
- Regan K, Kammann C, Hartung K, Lenhart K, Müller C, Philippot L, *et al.* (2011). Can differences in microbial abundances help explain enhanced N<sub>2</sub>O emissions in a permanent grassland under elevated atmospheric CO<sub>2</sub>? *Glob Chang Biol* **17**:3176–3186.
- Rensing C, Newby DT, Pepper IL. (2002). The role of selective pressure and selfish DNA in horizontal gene transfer and soil microbial community adaptation. *Soil Biol Biochem* **34**:285–296.
- Richardson M. (2009). The ecology of the *Zygomycetes* and its impact on environmental exposure. *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 5**:2–9.
- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, *et al.* (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* **1**:283–290.



- Romaní AM, Fischer H, Mille-Lindblom C, Tranvik LJ. (2006). Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. *Ecology* **87**:2559–2569.
- Rousk J, Bååth E. (2007). Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios. *FEMS Microbiol Ecol* **62**:258–267.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, *et al.* (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* **4**:1340–51.
- Sall S, Bertrand I, Chotte JL, Recous S. (2007). Separate effects of the biochemical quality and N content of crop residues on C and N dynamics in soil. *Biol Fertil Soils* **43**:797–804.
- Salles JF, Poly F, Schmid B, Le Roux X. (2009). Community niche predicts the functioning of denitrifying bacterial assemblages. *Ecology* **90**:3324–3332.
- Salonius PO. (1981). Metabolic capabilities of forest soil microbial populations with reduced species diversity. *Soil Biol Biochem* **13**:1–10.
- Scheffer M, Carpenter S, Foley JA, Folke C, Walker B. (2001). Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature* **413**:591–596.
- Schlöter M, Dilly O, Munch J. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Agric Ecosyst Environ* **98**:255–262.
- Setälä H, McLean MA. (2004). Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. *Oecologia* **139**:98–107.
- Seybold CA, Herrick JE, Brejda JJ. (1999). Soil resilience a fundamental component of soil quality. *Soil Sci* **164**:224–234.
- Shange RS, Ankumah RO, Ibekwe AM, Zabawa R, Dowd SE. (2012). Distinct soil bacterial communities revealed under a diversely managed agroecosystem. *PLoS One* **7**:e40338.
- Sharmin F, Wakelin S, Huygens F, Hargreaves M. (2013). *Firmicutes* dominate the bacterial taxa within sugar-cane processing plants. *Sci Rep* **3**:3107.
- Silvestro LB, Stenglein SA, Forjan H, Dinolfo MI, Arambarri AM. (2013). Occurrence and distribution of soil *Fusarium* species under wheat crop in zero tillage. *Spanish Journal of Agricultural Research* **11**:72–79.
- Six J, Feller C, Denef K, Ogle SM, de Moraes Sa JC, Albrecht A. (2002). Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils – Effects of no-tillage. *Agronomie* **22**:755–775.
- Smit E, Wolters A, Elsas JD Van. (1998). Self-transmissible mercury resistance plasmids with gene-mobilizing capacity in soil bacterial populations: influence of wheat roots and mercury addition. *Appl Environ Microbiol* **64**:1210–1219.
- Smith P. (2008). Land use change and soil organic carbon dynamics. *Nutr Cycl Agroecosystems* **81**:169–178.



- Song YN, Marschner P, Li L, Bao XG, Sun JH, Zhang FS. (2007). Community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the rhizosphere of intercropped wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biol Fertil Soils* **44**:307–314.
- Springael D, Top EM. (2004). Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends Microbiol* **12**:53–58.
- Steenwerth K, Jackson L, Calderon F, Scow K, Rolston D. (2005). Response of microbial community composition and activity in agricultural and grassland soils after a simulated rainfall. *Soil Biol Biochem* **37**:2249–2262.
- Strickland MS, Lauber C, Fierer N, Bradford MA. (2009). Testing the functional significance of microbial community composition. *Ecology* **90**:441–451.
- Suárez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG, Mendonça-Previato L, James EK, Venturi V. (2012). Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microb Ecol* **63**:249–266.
- Swift MJ, Andren O, Brussaard L, Briones M, Couteaux M-M, Ekschmitt K, *et al.* (1998). Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: three case studies. *Glob Chang Biol* **4**:729–743.
- Tardy V, Mathieu O, Lévêque J, Terrat S, Chabbi A, Lemanceau P, *et al.* (2013). Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environ Microbiol Rep* **6**:173-183.
- Terrat S, Christen R, Dequiedt S, Lelièvre M, Nowak V, Regnier T, *et al.* (2012). Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb Biotechnol* **5**:135–141.
- Thiele-Bruhn S, Bloem J, de Vries FT, Kalbitz K, Wagg C. (2012). Linking soil biodiversity and agricultural soil management. *Curr Opin Environ Sustain* **4**:523–528.
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S, Olivier J. (1997). ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat Comput* **7**:75–83.
- Tilman D. (1996). Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature* **379**:718-720.
- Tilman D. (1997). The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* **277**:1300–1302.
- Tilman D, Reich PB, Knops JMH. (2006). Biodiversity and ecosystem stability in a decade-long grassland experiment. *Nature* **441**:629–632.
- Tiunov AV, Scheu S. (2005). Facilitative interactions rather than resource partitioning drive diversity-functioning relationships in laboratory fungal communities. *Ecol Lett* **8**:618–625.
- Tobor-kaplon MA, Bloem J, Ro PFAM. (2005). Functional stability of microbial communities in contaminated soils. *Oikos* **1**:119–129.



- Toljander YK, Lindahl BD, Holmer L, Högborg NOS. (2006). Environmental fluctuations facilitate species co-existence and increase decomposition in communities of wood decay fungi. *Oecologia* **148**:625–631.
- Torsvik V, Øvreås L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **5**:240–245.
- Tscharntke T, Klein AM, Kruess A, Steffan-Dewenter I, Thies C. (2005). Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity - ecosystem service management. *Ecol Lett* **8**:857–874.
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem* **19**:703–707.
- Viaud V, Angers DA, Walter C. (2010). Toward landscape-scale modeling of soil organic matter dynamics in agroecosystems. *Soil Sci Soc Am J* **74**:1847-1860.
- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM. (1997). Human domination of earth's ecosystems. *Science* **277**:494–499.
- Vivant A-L, Garmyn D, Maron P-A, Nowak V, Piveteau P. (2013). Microbial diversity and structure are drivers of the biological barrier effect against *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS One* **8**:e76991.
- Voříšková J, Baldrian P. (2013). Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME J* **7**:477–486.
- De Vries FT, Hoffland E, van Eekeren N, Brussaard L, Bloem J. (2006). Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management. *Soil Biol Biochem* **38**:2092–2103.
- De Vries FT, Manning P, Tallowin JRB, Mortimer SR, Pilgrim ES, Harrison KA, *et al.* (2012). Abiotic drivers and plant traits explain landscape-scale patterns in soil microbial communities. *Ecol Lett* **15**:1230–1239.
- Wagg C, Bender SF, Widmer F, van der Heijden MGA. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**:5266–5270.
- Wakelin SA, Warren RA, Kong L, Harvey PR. (2008). Management factors affecting size and structure of soil *Fusarium* communities under irrigated maize in Australia. *Appl Soil Ecol* **39**:201–209.
- Van der Wal A, Geydan TD, Kuyper TW, de Boer W. (2013). A thready affair: linking fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes. *FEMS Microbiol Rev* **37**:477–494.
- Van der Wal A, van Veen JA, Smant W, Boschker HTS, Bloem J, Kardol P, *et al.* (2006). Fungal biomass development in a chronosequence of land abandonment. *Soil Biol Biochem* **38**:51–60.





- Wall DH, Bradford MA, St. John MG, Trofymow JA, Behan-Pelletier V, Bignell DE, *et al.* (2008). Global decomposition experiment shows soil animal impacts on decomposition are climate-dependent. *Glob Chang Biol* **14**:2261-2677
- Wertz S, Degrange V, Prosser JI, Poly F, Commeaux C, Freitag T, *et al.* (2006). Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environ Microbiol* **8**:2162–9.
- Wertz S, Degrange V, Prosser JI, Poly F, Commeaux C, Guillaumaud N, *et al.* (2007). Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environ Microbiol* **9**:2211–2219.
- Widmer F, Rasche F, Hartmann M, Fliessbach A. (2006). Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment. *Appl Soil Ecol* **33**:294–307..
- Williams MA. (2007). Response of microbial communities to water stress in irrigated and drought-prone tallgrass prairie soils. *Soil Biol Biochem* **39**:2750–2757.
- Williams MA, Myrold DD, Bottomley PJ. (2007). Carbon flow from <sup>13</sup>C-labeled clover and ryegrass residues into a residue-associated microbial community under field conditions. *Soil Biol Biochem* **39**:819–822.
- Wittebolle L, Marzorati M, Clement L, Balloi A, Daffonchio D, Heylen K, *et al.* (2009). Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* **458**:623–6.
- Wohl DL, Arora S, Gladstone JR. (2004). Functional redundancy supports biodiversity and ecosystem function in a closed and constant environment. *Ecology* **85**:1534–1540.
- Wu T, Ayres E, Li G, Bardgett RD, Wall DH, Garey JR. (2009). Molecular profiling of soil animal diversity in natural ecosystems: Incongruence of molecular and morphological results. *Soil Biol Biochem* **41**:849–857.
- Yachi S, Loreau M. (1999). Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. **96**:1463–1468.
- Youssef NH, Elshahed MS. (2009). Diversity rankings among bacterial lineages in soil. *ISME J* **3**:305–313.



# **ANNEXES**



# Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge in agroecology

Philippe Lemanceau · Pierre-Alain Maron · Sylvie Mazurier ·  
Christophe Mougel · Barbara Pivato · Pierre Plassart · Lionel Ranjard ·  
Cécile Revellin · Vincent Tardy · Daniel Wipf

Accepted: 22 July 2014  
© INRA and Springer-Verlag France 2014

**Abstract** Soils are living environments in which particularly abundant and diverse microbiome and fauna are evolving. The resulting biological functioning has a direct impact not only on soil fertility but also on a series of ecosystems services. Thus, microbial communities are involved in geochemical cycles in which microbial enzymes catalyse the different steps. Modulation of the corresponding activities is essential as these affect plant growth and environmental quality. In general, biodiversity affects both the productivity and stability of agroecosystems. It is therefore of paramount importance to take soil biodiversity and biological functioning into account when designing cropping systems and evaluating their impacts. The progress achieved in soil microbiology in recent years now makes it possible to propose analyses of soil biology, as has been feasible for many years for soil physicochemistry. These analyses obviously require the use of standardized procedures for soil sampling, measuring the abundance and diversity of the microbial communities, as well as the identification of bioindicators. Similarly, referential systems need to be established to interpret these analyses and diagnose the

biological status of soils, and, more especially, to determine whether the obtained values are within the range of variations normal for a given soil type and land use. Great progress to standardize such procedures and establish referential systems has been achieved during large-scale research programmes carried out to characterize biodiversity on national and European scales. These diagnostic elements need to be accompanied by recommendations. The aim of ongoing research is thus to propose aids for decision-making, based on the results of biological analyses, so attempts can be made to monitor and manage biodiversity to satisfy soil fertility requirements and ensure the ecosystem services expected of soils.

**Keywords** Agroecology · Biodiversity · Microbial communities · Plant growth and health · Soil biology · Soil fertility

## Contents

1. Introduction
2. Diagnosis of the microbiological state of soils
  - 2.1. Difficulties in studying soil microbiome
  - 2.2. Biodiversity-activities-functions
  - 2.3. Bioindicators
  - 2.4. Need for standardized referential systems
3. Ecological engineering
  - 3.1. Microbial inoculation
  - 3.2. Orienting the microbial populations/communities
4. Conclusions and prospects

## 1 Introduction

The sustainable management of soils has to take into account both agronomic and environmental challenges. Agriculture

This manuscript is the English version of the chapter ‘Qu’attendre des recherches en microbiologie du sol pour la connaissance et la gestion de la fertilité des sols?’ by Lemanceau et al. published in French in the book *Fertilisation et environnement*, Editions 3 Quae-Acta, 2014, ISBN (Quae): 978-2-7592-2055-7 and ISBN (Acta): 978-2-85794-280-1.

P. Lemanceau (✉) · P.-A. Maron · S. Mazurier · B. Pivato ·  
P. Plassart · L. Ranjard · C. Revellin · V. Tardy  
INRA, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, BP 86510,  
F-21065 Dijon cedex, France  
e-mail: philippe.lemanceau@dijon.inra.fr

C. Mougel  
INRA, UMR 1349 IGEPP BP35327, F-35653 Le Rheu cedex,  
France

D. Wipf  
Université de Bourgogne, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully,  
BP 86510, 21065 Dijon cedex, France

must necessarily maintain high and stable yields, and, at the same time, make economic use of fossil energy, inputs and natural resources and integrate biodiversity into the very process of production (Inra 2010). The implication is to produce more and better. These challenges require the development of innovative agricultural systems which use fewer inputs, are more respectful of the environment and deliver the expected ecosystem services. This will inevitably rely on a paradigm shift and reconciliation of the long-lasting conflict between agriculture and ecology. Until recently, ecology has essentially focused on poorly anthropized zones, and agriculture has attempted to adapt the environment to the crop, the extreme being soil-less crops where growing substrates serve merely as a support, and nutrition is provided by mineral solutions. The confrontation between agriculture and ecology stems from the significance of soil fertility which, for the agronomist, implies productivity and mineral nutrition, and, for the ecologist, biological equilibria and regulation.

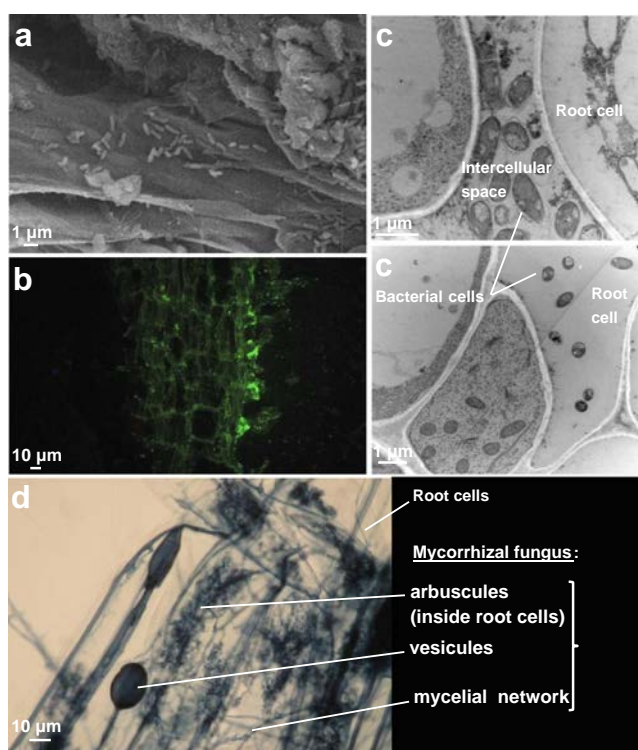
The above-mentioned paradigm shift therefore consists of adapting the crop to the environment by making the best possible use of biotic interactions, particularly between roots and microorganisms (Fig. 1). Such biotic interactions should

contribute to plant nutrition and health, and, thus, to soil fertility. The contribution of soil microorganisms to nutrition is linked to their involvement in geochemical cycles (mainly those of nitrogen and carbon, but also of iron and phosphorus), through the reactions that they catalyse as a result of enzyme syntheses. For the nitrogen cycle, these enzymes are well known, from the introduction of atmospheric molecular nitrogen into soils via the activity of nitrogenase in the nodules during symbiotic nitrogen fixation by leguminous plants, up to the final reduction of nitrogen oxides to  $N_2O$  (a greenhouse gas) and finally to  $N_2$  (Fig. 2). For the carbon cycle, they are less well known as the activities of the constituent enzymes are much more diverse due to the complexity of organic compounds and their degradation products. The functioning of both cycles has a direct impact on plant nutrition and also on the environment. Thus, the cultivation of leguminous crops helps to enrich soils in nitrogen while the reduction of nitrogen oxides which can result in  $N_2O$  emission contributes to the greenhouse effect. Loss of nitrogen through emissions of this gas and of  $N_2$  is detrimental to soil fertility. Similarly, the mineralization of organic compounds in soil releases nutritive elements for the plant, but also contributes to  $CO_2$  emissions detrimental to the environment. Soils also harbour numerous microorganisms which produce antibiotics or, at a more general level, molecules reducing the saprophytic growth of plant pathogenic agents or eliciting defence reactions in plants. Overall, the microbial biodiversity of soils contributes not only to the productivity but also to the stability (resistance/resilience) of the agroecosystem and thus to its sustainability.

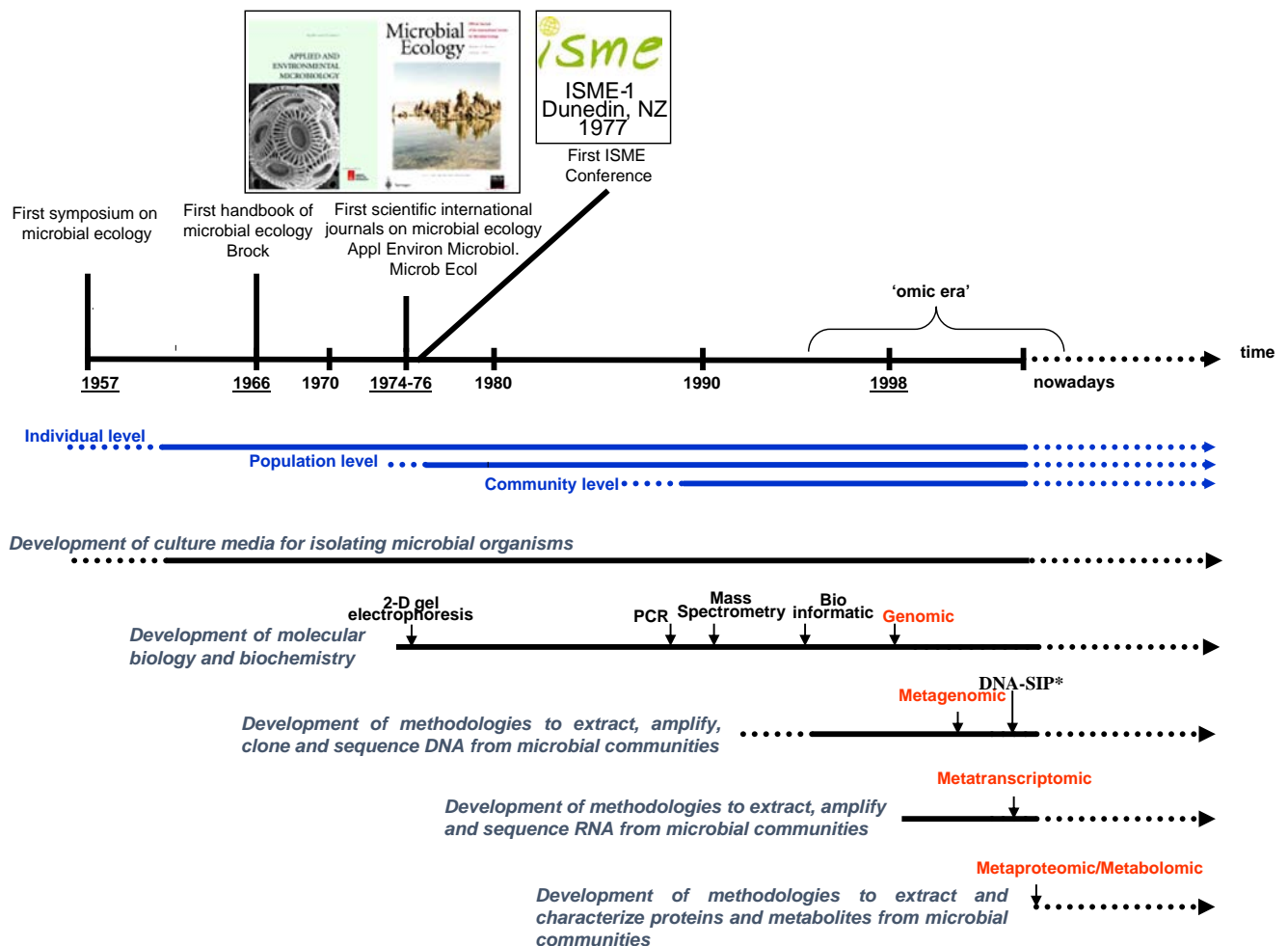
A major operational challenge for microbial ecology research is therefore to provide information allowing the diagnosis of soil biodiversity and biological functioning. This necessitates an effort to standardize sampling and analytical procedures, to develop appropriate bioindicators and to establish referential systems for interpreting the results. Such information relies on prior descriptive studies of biodiversity, determination of the relationships between biodiversity, activities and biological functioning, and characterization of the effects of environmental filters on diversity and on the above-mentioned relationships. The ultimate challenge is to apply the resulting diagnosis for decision-making in the form of recommendations for monitoring and management of biodiversity to ensure soil fertility and, more generally, to guarantee provision of ecosystem services.

## 2 Diagnosis of the microbiological state of soils

For a long time, soils were mainly considered as a support and a reservoir of the mineral elements needed for plant growth and development. The knowledge required for soil physical-chemical analyses and their interpretation was provided by



**Fig. 1** Illustrations of close interactions between plant roots and soil microorganisms: surface of medic root colonized by soil bacteria (rods of c.a. 1 µm) as observed by scanning electron microscopy (a) and confocal laser scanning microscopy (b) INRA/L. Avoscan<sup>®</sup>. Avoscan; cell and intercellular spaces (apoplast) of medic root colonized by soil bacteria as observed under transmission electron microscopy (c) INRA/L. Avoscan<sup>®</sup>; leek roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus* sp. as observed by optical microscopy (d) INRA/A. Colombet<sup>®</sup>



**Fig. 2** Principal steps in the development of microbial ecology (from Maron et al. 2007). \*DNA-stable isotope probing

extensive research. Awareness of the importance of life in soils (Gobat et al. 2010) and of its effect on plant growth and health then stimulated research in soil biology. As with the physical-chemical analyses, diagnosis of the biological component of soils is a two-step process consisting of analyses followed by their interpretation.

The general relevance of such a diagnosis became apparent during integration of the biotic interactions occurring in soil and rhizosphere to sustainably manage soils and promote provision of ecosystem services (including primary production). Thus, the European Commission clearly identified the need for a better understanding of soil biodiversity and biological functioning, and for the development of bioindicators to allow application of its soil management policy (COM(2012) 46, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52012DC0046>). This should contribute to the instigation of a framework directive for soils, as already exists for air and water. Application of this policy will require appropriate procedures and methods to characterize the biological component of soils, whether or not such soils are used for agriculture.

## 2.1 Difficulties in studying soil microbiome

The delayed development of soil biology analyses, as compared with physical-chemical analyses, is not only due to the late consideration of the biological component of soil fertility. It can also be explained by the very characteristics of microorganisms and soils. Microorganisms, as their name implies, are of microscopic size (in the order of one micrometer for bacteria). Their diversity in soils is huge with about one million species of archaea and bacteria per gram of soil (Bates et al. 2011; Torsvik and Øvreås 2002). Most (more than 90 %) of these microorganisms cannot be cultured on existing media (Rajendhran and Gunasekaran 2008; Schloss and Handelsman 2003), which meant until recently that they could not be studied. Soil microorganisms are also hidden within the soil which is a heterogeneous but structured matrix, and, thus, hinders access to this biotic component. The heterogeneity of the soil environment containing microorganisms also exists on different scales (aggregate, plot, landscape, country). These various difficulties for a long time only



permitted a distorted vision of soil biodiversity. This state of affairs can also be linked with the fact that the science of microbial ecology, based on analysis of the interactions between microorganisms and with their environment, is very young ( $\approx 50$  years). The first international colloquium took place in 1957, and the first international magazine was only launched in 1974 (Maron et al. 2007; Fig. 1). Considerable methodological advances, including extraction and quantification of soil DNA, and analysis of its polymorphism have been dedicated to overcome these difficulties, allowing now to obtain a more complete picture of the microbial communities present in soils. In particular, the spectacular reduction of costs, especially of high-throughput sequencing, which fell from 5,292 to 0.06\$ per DNA megabase between September 2001 and April 2013 as a result of methodological developments (<http://www.genome.gov/sequencingcosts/>), means that eventual access to the totality of soil biodiversity can now be envisaged.

## 2.2 Biodiversity-activities-functions

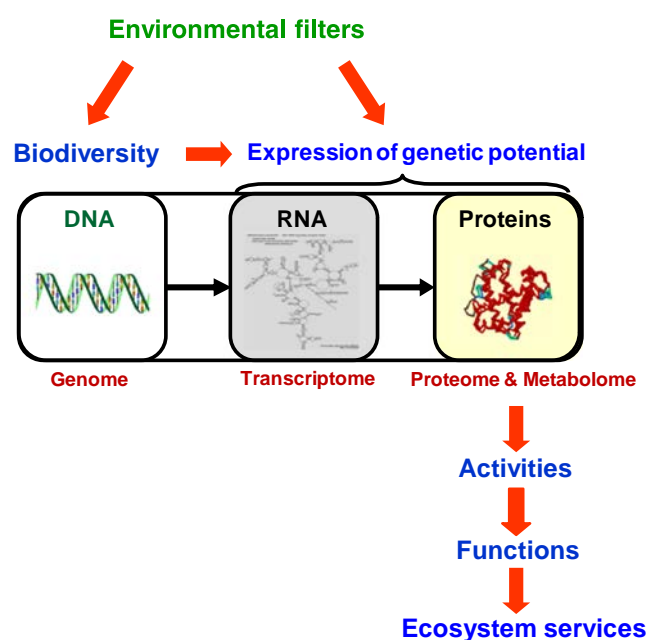
These methodological advances are facilitating response to the major challenges confronting soil biology research. These challenges are (1) to better understand soil biodiversity; (2) to evaluate the relationships existing between biodiversity, functions, and ecosystem services; and (3) to determine the impact of environmental conditions on soil diversity and biological functioning (Fig. 3). Such research, apart from its academic interest, is of operational value for the management of soil

fertility and, more generally, of the expected ecosystem services from soils.

Biodiversity indeed contributes to the productivity of agroecosystems and the ecological insurance associated with their stability, resulting both from their resistance to perturbations and their resilience once perturbations have ended. The effect of diversity on ecosystem functioning and stability is essentially illustrated by work on plant communities (Balvanera et al. 2006). The first studies were carried out on grassland systems at Rothamsted (Lawes et al. 1882). Subsequent investigations of plant communities led to the development of a conceptual system relating diversity to ecosystem functioning (Loreau 2000) and demonstrating, in particular, the positive effects of plant diversity on the functioning, performance and stability of agroecosystems (Naeem and Li 1997; Tilman et al. 1996, 1997). These effects are explained in terms of ecological insurance and complementarity of the niches occupied by the component populations of the communities investigated.

Thus, ecological insurance predicts that the risk and amplitude of variations in ecosystem functioning, following a perturbation, will be reduced if the number of species is high (Yachi and Loreau 1999). Each ecosystem function is ensured by a functional group which corresponds to a group of species performing the same function. Under stable environmental conditions, the presence of a minimal number of functional groups is essential to ecosystem functioning but the diversity within each group is of relatively minor importance because the species are redundant from a functional point of view. In contrast, under fluctuating environmental conditions, the presence of a great diversity of species will increase the probability that at least some of them will survive, or even prosper, whatever the conditions and thus ensure the maintenance of system functioning. This is why the level of diversity can be considered as a guarantee of ecosystem stability. This property is of particular importance in the case of agroecosystems regularly subjected to perturbations associated with the mode of land use and climatic variations.

Complementarity between niches but also biotic interactions, such as ecological facilitation and mutualism, are the principal mechanisms proposed to explain the positive link between biodiversity and ecosystem performance. These mechanisms are based on the observation that each species develops within a particular ecological niche; this niche being defined as a function of the requirements of the considered species at physical-chemical, trophic and biological levels, including its relationships with neighbouring species and the resulting modification of the habitat and community to which the species belongs. Different species therefore occupy different habitats and utilize different resources. Thus, an increase of diversity results in better performance (productivity) of the ecosystem due to better occupation of the space by the community and enlargement of the range



**Fig. 3** Diagrammatic representation of the relationship between diversity, expression of genetic potential, activities, microbial functions and, finally, ecosystemic services delivered by soils. Environmental filters impact diversity and expression of the genetic potential of the microflora (project EcoFINDERS)

of resources utilized. Furthermore, the decomposition products of one species may also act as a source for another species, thereby increasing niche availability and facilitating interactions.

As in macroorganisms, functional redundancy seems to be a parameter governing the stability (resistance and resilience) of the activities of soil microbial communities after perturbations (Girvan et al. 2005; Griffiths et al. 2000; Griffiths and Philippot 2013). In experiments carried out on grassland systems at Jasper Ridge (California), Horz et al. (2004) demonstrated that modification of the diversity of the nitrating community in soil in response to global changes could lead to an increase in nitrification, thereby illustrating that microbial diversity plays an important role in the nitrogen cycle. Although the mineralization of organic matter is currently considered as redundant, a positive relationship has recently been established between this function and the number of microbial species (Tardy et al. 2014), with mineralization falling significantly when microbial diversity is reduced; similarly, a loss of biodiversity was shown to affect the nitrogen cycle (Philippot et al. 2013b). Such effect of soil biodiversity on mineralization of organic matter directly impacts the release of mineral elements but also the emission of CO<sub>2</sub>, and therefore soil fertility and environmental quality, respectively.

The relationship between microbial biodiversity and productivity (fertility) was also clearly demonstrated during analyses of plant-microorganisms interactions. Thus, van der Heijden et al. (1998) showed that an increase in the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) was not only accompanied by an increase in plant diversity, thereby permitting more effective use of light resources at the aerial level and soil resources at the subterranean level, but also improved phosphorus nutrition and finally led to an increase in plant biomass (productivity).

The aim in soil biology research, apart from simply describing its biodiversity, is to determine the relationships between soil diversity and biological function and ultimately the provision of ecosystem services (Fig. 3). For example, the minimal diversity needed for expression of the activities required for a given function, needs to be determined in relation to the functional redundancy. Another research goal is to identify the genes controlling given functions in order to allow the characterization of the corresponding functional communities encompassing different microbial species that have in common these functional genes. Certain of these genes are already known, particularly for the nitrogen cycle (Philippot 2002) and the production of certain antibiotics involved in protection against soil-borne diseases (Weller et al. 2002). However, the proportion of known genes is minimal and numerous genes coding for other activities likely to affect plant growth and health, and, therefore soil fertility, remain to be discovered. The systematic search for these genes will be facilitated by the new high-throughput sequencing techniques

and analysis of the metagenome (total genomes) in soil models (Vogel et al. 2009) presenting contrasting levels of fertility (Mougel et al. 2011). At a more general level, determination of the biodiversity-function relationship should lead to identification of pertinent bioindicators of the biodiversity and of the biological functioning of soils in relation to the expected ecosystem services. This relationship is currently being investigated in long-term observatories allowing to characterize together soil biodiversity, fertility and ecosystem services.

### 2.3 Bioindicators

Numerous molecular tools have been developed over the past 20 years which today allow the routine characterization of microbial communities at both quantitative and qualitative levels (Maron et al. 2011).

The total microbial communities and communities determining a particular function or belonging to taxonomic groups of particular interest or presenting a danger can therefore be quantified. The abundance of total microbial communities can be measured from the microbial molecular biomass (Dequiedt et al. 2011). The microbial biomass is a well-known marker of soil biological functioning (Horwath and Paul 1994) and a sensitive and early indicator of changes in soil management (farming practices, contamination; Ranjard et al. 2006). The molecular biomass is determined by quantifying the microbial DNA in soil extracts and is correlated with the microbial biomass (Marstorp et al. 2000; Leckie et al. 2004) measured after fumigation-extraction (Vance et al. 1987), although this relation may vary according to the soil type and more specifically to their carbon content (Leckie et al. 2004). The advantage of molecular biomass, compared with the biomass obtained after fumigation-extraction, is that it can be measured on dry soil samples at the same time as physical-chemical analyses and that it allows the development and application of referential systems, using a moderate-throughput system, for interpreting analysis data (cf. Section 2.4).

Functional communities, or those belonging to a particular taxonomic group, can also be quantified from soil DNA extracts by applying quantitative polymerase chain reaction (PCR used to amplify DNA) to determine the number of copies of the functional gene shared by populations in the functional community or of a specific sequence in the targeted taxonomic group. One example of functional community concerns bacteria with the ability to synthesize the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol (Mavrodi et al. 2007). The level of natural suppressiveness of soils to take-all, caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, has been associated with the density of bacteria harbouring sequences encoding the synthesis of corresponding antibiotic (Raaijmakers et al. 1997). The copy number of this sequence could therefore be an indicator candidate for assessing of the risk of disease expression. The presence and abundance of particular

microbial groups including beneficial microorganisms, such as symbiots (cf. Section 3.1), or deleterious organisms representing health risks, for animals, humans or plants, may also be quantified using taxonomic marker genes (Redecker and Raab 2006).

From a qualitative point of view, the composition of communities can be characterized by their structure, i.e. assemblage of the different constitutive populations, and by their diversity, i.e. the different types of organisms present. The genetic structure may be determined by molecular fingerprints of the communities. Until recently, comparisons between studies were hampered by the great variety of techniques employed (A-RISA, ARDRA, DGGE, TGGE, T-RFLP...), and some sort of standardization was clearly necessary. This was undertaken by national and European programmes (Gardi et al. 2009), such as those conducted in the UK (Countryside Survey, [www.countryside-survey.org.uk](http://www.countryside-survey.org.uk)) and in Europe (EcoFINDERS, <http://www.ecofinders.eu/>, Lemanceau 2011) which use the terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) technique and that conducted on the French soil survey (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols, RMQS) (<http://www.gissol.fr/programme/rmqs/rmqs.php>) which uses the automated ribosomal intergenic spacer analysis (A-RISA) technique. Due to the progress achieved with new high-throughput sequencing technologies and their highly significant reduction in cost, the diversity of microbial communities can now be compared in contrasted situations of soil type, climate and land use. Analyses of the relationships between soil diversity, fertility and delivered ecosystem services provide opportunities for identifying new bioindicators.

## 2.4 Need for standardized referential systems

Once sensitive, reliable and easy-to-use bioindicators have been developed, it is essential to know their range of variation in order to interpret the measured values and diagnose the biological state of a soil.

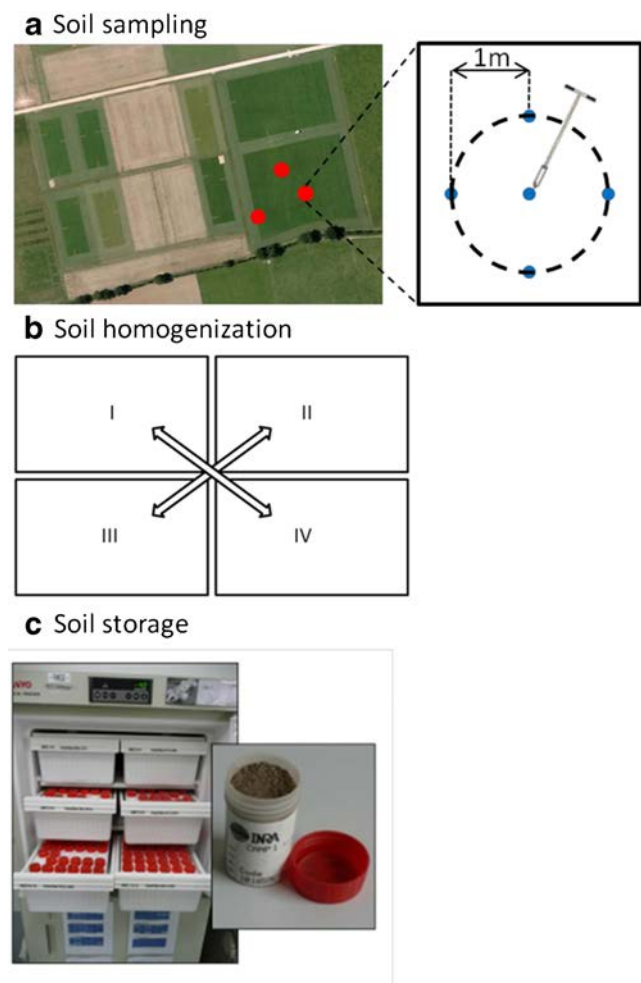
This requires prior research to evaluate the impact of different environmental situations on (1) the abundance and diversity of the microbial communities and (2) the activities of those communities, soil biological functioning and the ecosystem services provided. The environmental filters affecting microbial communities and their activities therefore have to be identified. Thus, to take into account the effect of environmental conditions on microbial communities and their functioning, long-term studies are set up on sites especially equipped to measure soil biological functioning and the ecosystem services of interest, and to determine their relationship with soil biodiversity. This type of approach is being applied by the European programme EcoFINDERS in which several long-term observatories have been identified in Europe as representative of types of climate and land use.

From an operational point of view, the interpretation of the soil biological analyses requires referential systems which indicate the normal range of variations of the bioindicators (abundance, microbial composition) according to the type of soil, climate and land use. Standardization of the procedures is paramount for construction of these referential systems and their application to soil biological analyses. Major progress has been achieved in this field during the last few years by national programmes in France (Bispo et al. 2009, programme ADEME Bioindicateur, <http://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/>; Dequiedt et al. 2011; Peres et al. 2011; Ranjard et al. 2010), in the Netherlands (The Biological Indicator system for Soil Quality, Rutgers et al. 2009), in the UK (Griffiths et al. 2011), and, more recently, in Europe (projects ENVASSO <http://www.envasso.com/>, EcoFINDERS). All these programmes aim at analysing soil communities, especially microbial, on very large spatial scales. Such large-scale analyses require massive sampling efforts, which in France, for example, are carried out by the RMQS managed by Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) Sol (<http://www.gissol.fr/index.php>) and operational structures to extract the DNA from these extremely numerous samples, then manage, store and analyse them (platform GenoSol [http://www2.dijon.inra.fr/plateforme\\_genosol/](http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/), Ranjard et al. 2009).

The soil sampling strategy used for microbial analyses in France and Europe (project EcoFINDERS) consists of harvesting several samples, the number (three on average) depending on the heterogeneity of the plot to be analysed. Each of these samples is obtained by mixing five sub-samples of 500 g taken (by drill) from the top 20 cm of the soil. Each bulk sample is then sieved and homogenized, and reduced in mass to 100 g by quartering in order to facilitate storage (Fig. 4; Plassart et al., personal communication). The extraction of DNA is carried out on sub-samples of 1 g for bacteria and 5 g for fungi. These values were previously determined from studies to measure the minimal soil mass beyond which the diversity no longer increases (Ranjard et al. 2003).

Similarly, an effort has been made to standardize the soil DNA extraction procedure by adopting an ISO standard (ISO Standard 11063 2009; Philippot et al. 2010; Petric et al. 2011). This procedure has recently been optimized to ensure good amplification of the DNA not only from bacterial communities but also fungi and archaea (Plassart et al. 2012).

The distribution of microbial communities, in terms of abundance, is heterogeneous but structured on different spatial scales. Parameters contributing to this structuring are (1) on a microscale—the structure, porosity and organic carbon content of the soil (Ranjard and Richaume 2001); (2) on the scale of a farm plot—the texture (Johnson et al. 2003; Lejon et al. 2007), pH (Bååth and Anderson 2003), organic matter content (Lejon et al. 2007), land use (Nicolardot et al. 2007) and plant cover (Lejon et al. 2005); and (3) on larger scales (landscape,



**Fig. 4** Sampling strategy for soil microbiological analyses (from Plassart et al., unpublished data): three soil samples are collected (red dots) per analysed plot, each sample results from five pooled sub-samples (blue dots) (a); such soils samples are sieved and homogenized by quartering (b); samples are finally aliquoted (100 g) and stored at  $-40^{\circ}\text{C}$  (c)

country)—the physical-chemical properties and land use (Dequiedt et al. 2011). Thus, on the scale of France, the molecular biomass, which represents the microbial abundance (Section 2.3), varies from 5 to 15  $\mu\text{g}$  of DNA per gram depending on the soil (Fig. 5). These variations are associated with the major soil types and in particular their physical-chemical properties and land use. Thus, the molecular biomass values are positively linked to the clay and Ca contents, pH value and cation exchange capacity of soils (Dequiedt et al. 2011). The mean molecular biomass values are highest in grassland and lowest in orchards and vineyards (Fig. 6). This latter observation may be linked to the very poor plant diversity observed in orchards and vineyards due to perennial culture of the same plant genotypes and the frequent absence of grass between the rows in these crops. More generally, it is clearly apparent from reference values obtained at a national level that measurements of molecular biomass must be

interpreted with regard to the normal range of variations for a given soil type and mode of land use (Figs. 5 and 6).

The analyses performed on soil samples obtained from the RMQS indicate that, like their abundance, the genetic structure of communities based on A-RISA fingerprinting is also heterogeneous but spatially structured (Dequiedt et al. 2009). This distribution is again affected by soil type (physical-chemical characteristics, especially pH) and land use, especially the degree of intensification. The major influence of pH on the structure and diversity of microbial communities was also demonstrated during analogous studies in the UK (Griffiths et al. 2011) and USA (Fierer and Jackson 2006; Jones et al. 2009).

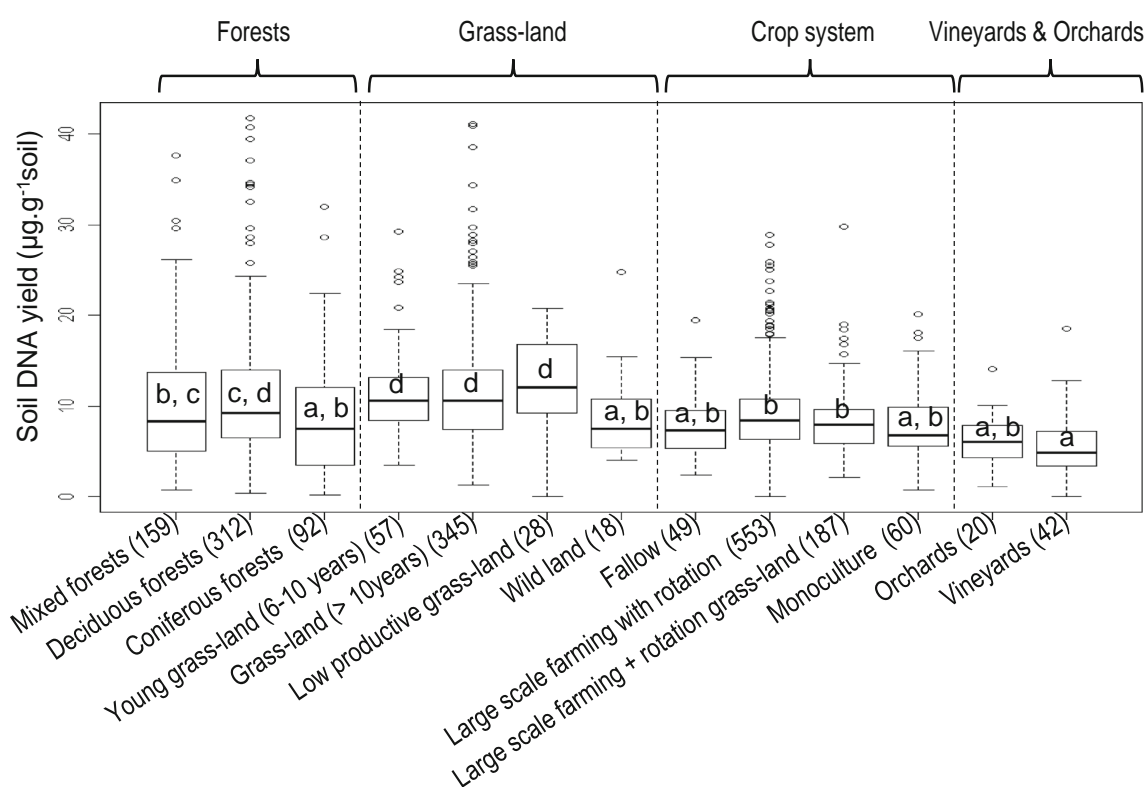
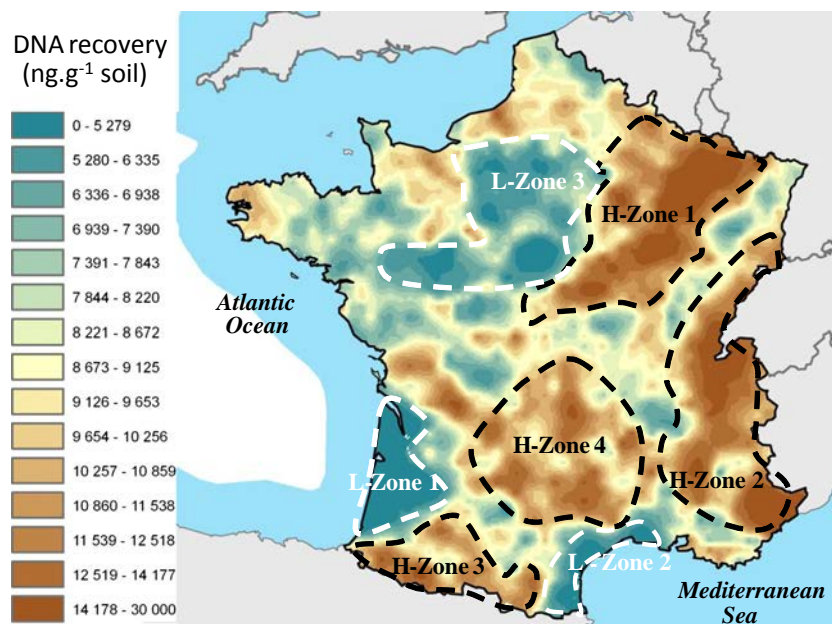
### 3 Ecological engineering

Diagnosis of a soil's biological state must obviously be accompanied by recommendations to improve, maintain or even restore fertility as well as the associated ecosystem services. Two types of ecological engineering strategies can be used. The first relatively classical approach consists of inoculating plants with strains selected for their beneficial activities, whereas the aim in the second approach, which is more ambitious and more complex, is to orient the indigenous microbial communities by adapting the farming system.

Both strategies rely strongly on the management of the interactions occurring between plants and soil microorganisms in the rhizosphere. In fact, these microorganisms are mostly heterotrophic and therefore rely on the primary production provided by plants which are autotrophic. During plant development, a significant proportion of photosynthates ( $\approx 20\%$ ) is released in the form of rhizodeposits (Nguyen 2003) and, at the end of its development cycle, the plant organic compounds are returned to the soil. The plant selects from the soil microflora those populations best adapted to the rhizosphere environment and these will differ according to the plant genotype (Manter et al. 2010). Maintenance of the release of rhizodeposits during plant evolution and its general occurrence throughout the plant kingdom suggests that the corresponding cost is compensated by benefits for the plant (for review, see Lambert et al. 2009). Thus, the microbial populations selected by the plant in its rhizosphere would be beneficial to its growth and health, and thus facilitate its adaptation in situations of low fertility (e.g. AMF and nitrogen-fixing bacteria; Section 3.1) and/or of high densities of pathogenic populations. The decline of take-all in wheat has thus been attributed to the selection, by roots infected with the pathogenic agent, of bacterial populations producing antibiotics (Section 2.2), which may probably have helped to maintain this plant species overtime (Cook et al. 1995). Generally speaking, the maintenance of plant species in



**Fig. 5** Variations in microbial molecular biomass on the scale of France based on observations obtained by the French Network for the Measurement of Soil Quality “Réseau de Mesure de la Qualité des Sols” (<http://www.gissol.fr/programme/rmq/rmq.php>). The variations of microbial biomass are represented by a range of colours from *brown shades*, corresponding to soils with a high molecular biomass ( $H, >9\,000\text{ ng.g}^{-1}$ ), to *green shades*, corresponding to soils with a low molecular biomass ( $L, <7\,000\text{ ng.g}^{-1}$ ) (Dequiedt et al. 2011)



**Fig. 6** Mean values and ranges of variations of the microbial molecular biomass on the scale of France according to land use, based on observations obtained by the French Network for the Measurement of Soil Quality (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols; <http://www.gissol.fr/programme/rmq/rmq.php>). The numbers between brackets indicate the number of sites sampled for the corresponding types of land use; the letters indicate the significant differences between different types of land

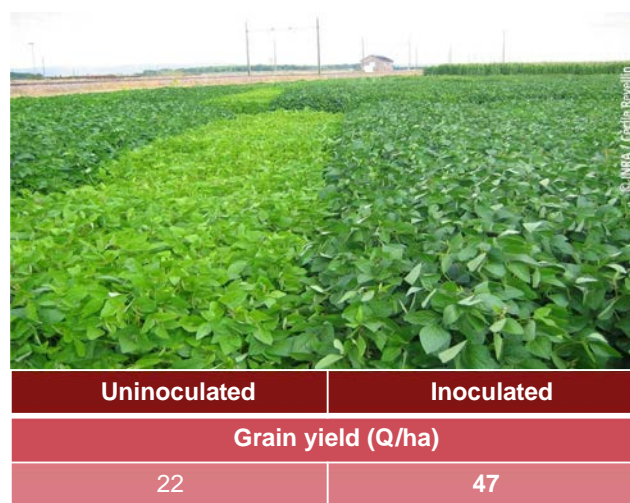
use ( $P > 0.05$ ) and the standard deviations indicate the ranges of variations per type of land use (Dequiedt et al. 2011). The mean and range of variations of microbial molecular biomass vary according to the land use, the lowest mean value being found in land uses with the lowest plant diversity (orchards, vineyards) and the highest in land uses with the highest plant diversity (grass-lands)

poorly anthropized situations seems to have relied on co-evolutionary processes in plants and microorganisms which involve reciprocal benefits. Some of these processes are very ancient, for example 60 million years for symbioses with nitrogen-fixing bacteria (Sprent 2008) and 450 million years for endomycorrhizal symbioses (Redecker et al. 2000).

### 3.1 Microbial inoculation

Two main examples are described concerning the introduction of selected strains of microorganisms which establish symbiotic associations with the plant-host.

The first example is the symbiotic association between *Rhizobia* and leguminous plants. This reciprocally beneficial association provides the bacteria with the carbon resources necessary for growth and the bacteria assist the plant by fixing the atmospheric nitrogen essential to its development. For a long time (until the beginning of the twentieth century), this biological fixation of atmospheric nitrogen was the only way that nitrogen compounds could enter the soil, and, on a world scale, even today ensures a greater supply than fertilisers. The estimated amount is 122 million tons per year (Herridge et al. 2008), half of which is fixed by the *Rhizobia*-leguminous symbiosis (Werner and Newton 2005; Lindstrom et al. 2010). Although the beneficial effect of leguminous plants on soil fertility has been known since antiquity, the first agronomic applications date from the beginning of the twentieth century. As soon as it became possible to cultivate *Rhizobia*, these nitrogen-fixing symbiotic bacteria were added to the seeds of leguminous plants at the time of sowing. This represents the most ancient application of bacteria in agriculture. It has been used ever since throughout the world and has become a common agricultural practice. Different crops are inoculated, including fodder crops such as alfalfa and clover, and grain legumes such as peas, beans and soybean. Each year, millions of hectares throughout the world have been and are currently inoculated with different species of *Rhizobia* (Catroux et al. 2001). Thus, the inoculation of soybean (Fig. 7), a legume originating from the Far East, has extended cultivation of this species to soils devoided of the corresponding symbiotic bacteria (*Bradyrhizobium japonicum*) throughout the world in less than 50 years; this crop now covers more than 100 million hectares (Lindstrom et al. 2010). Work has recently been carried out to explore the feasibility of inoculating strains of *Rhizobium* which not only fix atmospheric nitrogen during symbiosis with leguminous crops but also reduce  $N_2O$  to  $N_2$ , and thus help to reduce emission of this greenhouse gas (Henault and Revellin 2011). Trials under controlled conditions have shown that  $N_2O$  emissions can be decreased by inoculating soybean with the strain *B. japonicum* G49, which possesses the ability to reduce  $N_2O$  to  $N_2$ . This property has also been demonstrated in the strain *Sinorhizobium meliloti* 2011 in symbiosis with alfalfa.



**Fig. 7** Example of yield promotion of soybean when inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. Bacterial symbiosis leads to a better nitrogen nutrition of the host-plant and therefore to a better growth and grain yield

Application of this property is currently being assessed under field conditions.

The second example is the symbiotic mycorrhizal symbiosis which likely appeared more than 450 million years ago (Redecker et al. 2000) and made it possible for the first plants to colonize land. Mycorrhizal associations have proved so necessary and beneficial that, over the past 300 million years, the great majority of higher plants have conserved this symbiotic system and both partners have co-evolved together. It is rare to find a non-mycorrhized plant in nature or even in cultivated plants (with the exception of *Brassicaceae* and *Chenopodiaceae*). Arbuscular mycorrhiza are present in most cultivated plants (agricultural and horticultural), ranging from aromatic plants to fruit trees and including cereals. The hyphae of AMF colonize the plant's roots and are able to explore a volume of soil that is 1 000 times greater than that explored by the roots alone (Smith and Read 2008). They create specific structures known as arbuscules which allow the transfer of water and nutrients between both partners (Fig. 1d). AMF thus play the role of biofacilitators, improving plant nutrition and resistance to biotic stresses such as water deficit (Gianinazzi et al. 2010). They also influence plant development and the quality of plant products and in this way act as bioregulators. In return, the fungus benefits from photosynthates (up to 20 %) produced by the plant in the form of carbon compounds (Smith and Read 2008). Although the principal advantage conferred by the mycorrhiza is trophic in nature, non-nutritional effects are also observed. Thus, mycorrhizal fungi (MF) act as bioprotectors by reinforcing the natural defences of the plant against soil pathogens (Gianinazzi et al. 2010). In addition, the mycelial network encourages better retention of the aggregates and stabilization of the soil structure, thus contributing to soil quality. For several years, research has demonstrated the interest of using mycorrhizal

cultures to reduce chemical inputs, as well illustrated with horticultural and vegetable soilless crops, so long as the cultural practices applied are compatible with the development and beneficial expression of mycorrhizal symbioses (Gianinazzi et al. 2010). The interest of inoculating selected strains of AMF has thus been demonstrated for numerous crops such as onion, corn, clover, leek, artichoke, sweet potato, asparagus, olive, apple, pear, grape vine, raspberry, strawberry, rose, liquidambar, Virginia creeper, catalpa and lilac (for review, see Gianinazzi et al. 2010). Recently, the use of mycorrhiza to improve the quality of agricultural products by their enrichment with compounds beneficial to health and taste, such as sulphur molecules (onion), carotenoids (sweet potato), essential oils (basil) or oligoelements (lettuce) has been reported (Baslam et al. 2011; Copetta et al. 2006; Gianinazzi et al. 2010). For the past 50 years, valorisation of indigenous populations of MF has been hindered by the reduction and simplification of crop rotations, the use of synthetic inputs and the cultivation of new plant genotypes. Possible application of inoculation strategy in open field crops is also strongly hindered by inoculant available on the market at prices compatible with the economic activity. Indeed, production of inocula is particularly difficult and therefore expensive since MF are obligatory symbionts and require the help of a host-plant for their multiplication. Nevertheless, in recent years, systems used to produce inocula have evolved considerably, passing from direct production on nursery plots for uses in situ, to production in containers in glasshouses and more recently to tanks in vitro for large-scale usage.

Other applications of microbial inoculation have been tested using mutualistic microorganisms to improve soil fertility; however, the results obtained are poorly reproducible due to the frequent absence of persistence of the inoculum in soils. This is associated with the presence of indigenous microorganisms in the soil which are better adapted to the biotic and abiotic environment than the introduced strain.

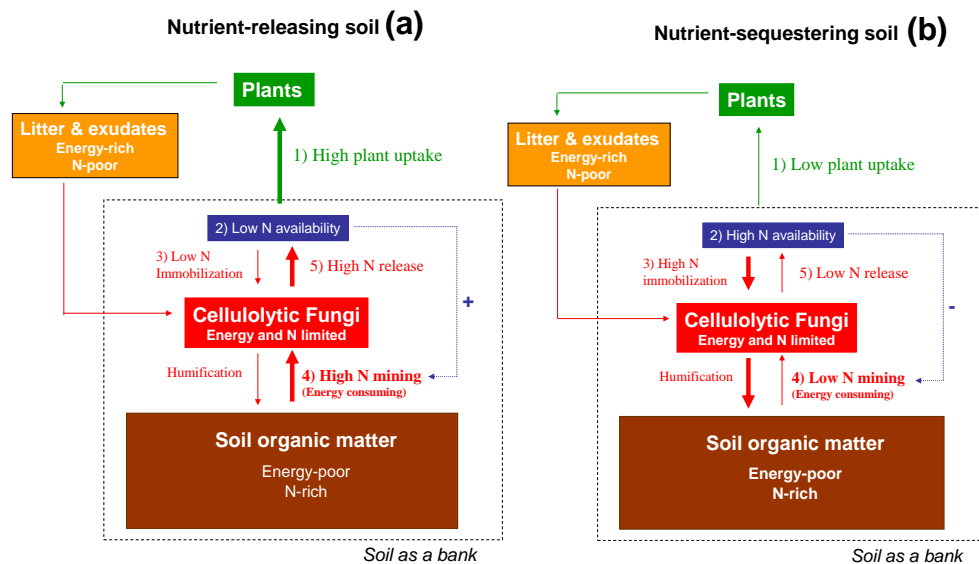
### 3.2 Orienting the microbial populations/communities

In the light of these findings, a change of paradigm has been proposed. This consists of no longer introducing selected strains but instead making use of indigenous populations by promoting among microbial communities those favourable to plant growth and health through the adoption of suitably adapted farming practices. Again, these agricultural practices are essentially based on managing the primary products of plants, whether these are released during the plant life cycle as rhizodeposits, or after as crop residues.

*Soil functioning as a nutrient bank* The soil organic matter (SOM) derived from plant development contains very large amounts of nutrients (nitrogen, phosphorus) representing, for example, 30 to 100 times the annual uptake of nitrogen from a

permanent grassland or a forest. These nutrients may be sequestered within the SOM for several decades, even centuries, before being released by microbial decomposition. Therefore, most of this organic stock of nutrients is not available to plants which are only able to absorb soluble forms. However, the microbial communities of decomposers (essentially fungi) are able to mineralize this recalcitrant SOM (Fontaine et al. 2011; Fig. 8). Thus, in ecosystems with low anthropogenic pressure, soils function as a nutrient bank with microbial communities contributing to the formation of organic reserves, when nutrient availability in the soil solution is high, and to the mineralisation of these reserves, when the soil solution is nutrient-deficient, thereby ensuring the mineral nutrition of plants. However, this mineralization is accompanied by the emission of CO<sub>2</sub>, a greenhouse gas. These observations could be applied to cultivated soils to find cropping systems, which are able to modulate the amplitude of the variations in SOM storage/mineralization, as for example those involving a continuous plant cover of soils. In this way, the release of nutrients from SOM would be adapted to the plant's requirements, thereby maximizing its production potential and at the same time minimizing CO<sub>2</sub> emission and N losses by leaching or denitrification.

*Repression of nitrification* Another example concerns the nitrogen cycle and more especially the nitrification, which is one of the main microbial processes responsible for nitrogen losses from terrestrial ecosystems. During this process, ammonium, which is relatively stable in soils, is oxidized to nitrate—a very mobile form of nitrogen. Thus, nitrate cannot only be transformed into gaseous nitrogen by denitrification but can also be readily lost due to leaching. This not only implies losses in terms of fertility but also adverse effects on the environment. An elegant series of experiments performed over the past 10 years has demonstrated a new way of limiting mineral nitrogen losses due to nitrification via the host-plant. Lata et al. (2000, 2004) demonstrated an inhibitory effect of *Hyparrhenia diplandra* on nitrification which resulted from simple competition between plants and nitrifying microorganisms for ammonium. This inhibition was associated with presence, in the root exudates, of molecules such as brachialactone which specifically inhibit two enzymes (ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase) involved in the oxidation of ammonium to nitrite, during the first step of the nitrification process (Subbarao et al. 2009). Field assessment for 3 years of plants exhibiting high production of these inhibitory molecules revealed a reduction of nitrification of up to 90 % together with considerable reduction of the number of nitrifying microorganisms (Subbarao et al. 2009). Research is currently underway to introduce this trait into cultivated plants, which might not only reduce the losses of mineral nitrogen but also limit emissions of the greenhouse gas N<sub>2</sub>O by denitrification (Philippot and Hallin 2011).



**Fig. 8** Diagrammatic representation of the activity of the fungal decomposer community according to the level of nitrogen requirements of the plant. When requirements are high (a), the mineral concentration in the soil solution falls leading to mineralization of the soil organic matter (rich in nitrogen and poor in energy); this situation leads to a release of

nutrients to the plant but also an emission of CO<sub>2</sub> and de-stocking of the soil carbon. When requirements are low (b), the fresh organic matter (energy-rich and nitrogen-poor) is transformed by the fungal community of decomposers into soil organic matter (humification) contributing to carbon storage in the soil (Fontaine et al. 2011)

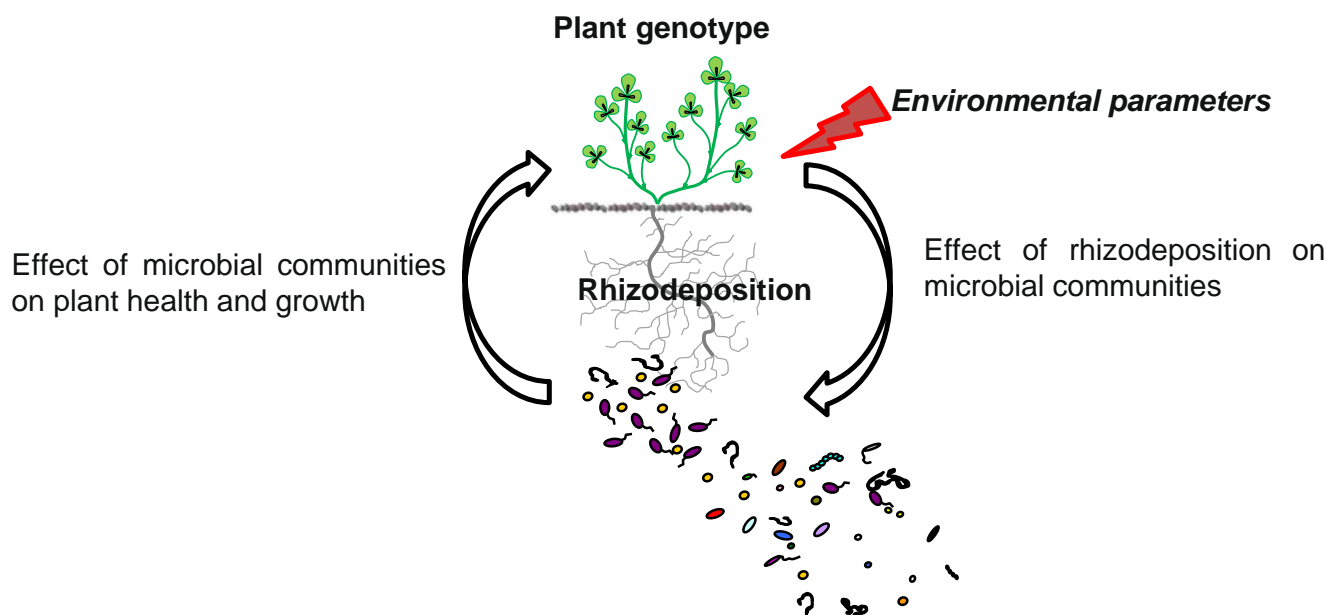
*Research for plant genotypes promoting microbial communities beneficial to plant growth and health* Over the past decades, plant breeding programmes have produced high-performing cultivars and significantly contributed to the increased yields and technological quality of agricultural products. This has occurred at the same time as the increased use of synthetic inputs to optimize expression of the genetic potential of selected cultivars. This approach is based on a general strategy which consists in adapting the environment to the crop, with soilless crops as extremes. In contrast, the proposed change of paradigm in agroecology consists of adapting the crop to the environment, by searching for plant genotypes which require less inputs and optimize better the soil resources specially by selecting within the soilborne microbiome populations that are beneficial for their growth and health (Fig. 9). Obtaining these genotypes first requires identification of the genetic and ecophysiological traits of the plant that are involved in selecting these favourable microbial populations (Friesen et al. 2011). Several strategies have been proposed to attain this objective. The first is a genetic association approach involving cultivation of numerous plant genotypes in a given soil. The possible variations in development of these genotypes are assumed to be at least partly associated with the variations in composition of the microbial community in the rhizosphere. The populations specifically identified in the rhizosphere of genotypes exhibiting the best growth are then tested for their aptitude to promote the growth/health of the host-plant (Zancarini et al. 2013a, b). Corresponding research on the model plant *Medicago truncatula* is underway (Zancarini et al. 2013a, b).

The second strategy is based on comparison of the microbial communities associated with a wild plant genotype (WT) and with a series of mutants of that genotype all cultivated in the same soil. The mutants presenting poorer growth/health than WT are identified and their microbial communities are compared with those of WT. The populations present in the rhizosphere of WT, but not in that of the mutants, are considered as possible candidates for explaining the better growth and health of WT. If this effect is confirmed in complementary trials in which WT genotype is cultivated in gnotobiotic conditions in the presence of those candidates, the WT genotype is then compared with that of the mutants, to identify the candidate genetic traits involved in selection of the corresponding beneficial populations.

Finally, recent research conducted on *Arabidopsis thaliana* has led to the concept of a principal rhizosphere microbiome, corresponding to the endophytic microbial populations found in the host-plant irrespective of the type of soil and physiological state of the plant (Bulgarelli et al. 2012; Lundberg et al. 2012). The authors put forward the hypothesis that the corresponding microbial groups would consist of favourable microbial populations, but again this hypothesis needs to be tested in complementary trials.

In each of the proposed approaches, the composition of the microbial community is characterized by high-throughput sequencing. All these studies require complementary expertise in microbial ecology, plant ecophysiology and genetics, and should eventually result in the development of new strategies for the genetic selection of cultivated plants which are not only productive but also more thrifty with regard to input requirements and which best valorise the regulations and interactions between organisms (Zancarini et al. 2013b).





**Fig. 9** Diagrammatic representation of the relationships between plant genotype and soil microbial communities. Rhizodeposition varies according to the plant genotypes and environmental conditions. Resulting variations of rhizodeposition impact microbial communities (abundance,

diversity, activity) in the rhizosphere. In return, modifications of microbial communities impact plant growth and health and consequently rhizodeposition. These reciprocal interactions therefore correspond to a feedback loop

#### 4 Conclusions and prospects

Research in soil microbial ecology has progressed considerably during the last two decades, and procedures can now be proposed to diagnose the biological state of soils in relation to their fertility. This diagnosis is based on (1) analysis of the abundance and composition of the microbial communities, and of specific bioindicators and (2) interpretation of the corresponding analyses by comparing them with reference values representing the normal range of variations for the parameters analysed. These reference values are obtained from large-scale analyses carried out on national, European and even continental scales with the support of global initiatives such as the Global Soil Biodiversity Initiative (<http://globalsoilbiodiversity.org/>) and the Global Soil Partnership (<http://www.fao.org/globalsoilpartnership/>). Progress has been assisted by the development of specialized structures and platforms. Research is underway to determine the relationships between diversity and biological functions in different environmental situations so that new bioindicators of soil biological state can be developed and the corresponding range of variations specified.

Several standardized procedures also exist for characterization of the soil fauna. These procedures are based on the extraction of each type of organism and their description, which is essentially based on morphological characters. One possible improvement, as with the characterization of microbial communities, would be to extract the DNA rather than the soil organisms, then amplify specific sequences and finally study their polymorphism (Orgiazzi et al., submitted). This approach would obviously depend on the specification of

appropriate soil sampling procedures, extraction of the DNA from very large volumes of soil and definition of the specific targeted sequences (Orgiazzi et al., submitted).

Ecological engineering research, based on diagnosis of the biological state of soils, is faced with the major challenge of proposing decision-making aids so that recommendations can be formulated, as routinely done on the basis of physical-chemical analyses. Such research lies in the field of agroecology where the aim is to valorise biodiversity and regulations among organisms and communities. In the case of soil biology, two principal approaches can be considered.

The first consists of the introduction of microbial strains selected for their beneficial effects. This approach is used in large-scale applications especially to inoculate soybean with *Bradyrhizobium*. Where non-symbiotic bacteria are concerned, however, such applications are greatly hampered by the lack of reproducibility of the beneficial effects. This might be improved by searching for compatible plant genotype-microbial genotype associations which would ensure better survival of the inoculum (Smith et al. 1999). Similarly, the large-scale production of AMF could be optimized together with the conditions of plant inoculation in relation to the evolution of culturing systems (inoculation of plug-plants).

The aim in the second approach is to reconsider the cropping systems so as to favour the microbial populations and activities beneficial to plant growth and health, and, at the same time, reduce adverse environmental effects. This will require the development of plant genotypes which valorise the biotic resources of soils and select beneficial communities within their rhizosphere. The challenges are particularly great

as regards the significant, but under-exploited, proportion of photosynthates devoted to rhizodeposits (Philippot et al. 2013a). The general goal is to integrate into the very conception of farming systems, an awareness of the influence of husbandry techniques (e.g. crop rotations, crop associations, intercropping, cover crops, crop residue management) on microbial abundance, diversity and activity. One way is to increase the use of leguminous crops so as to get maximum benefit from the entry of nitrogen into soils via biological fixation.

**Acknowledgments** This work was supported by the European Commission within the EcoFINDERS project (FP7-264465). The authors are grateful to Diana Warwick for helping with the English text and to Laure Avoscan and Annie Colombet for photos of microscopic observations.

## References

- Bååth E, Anderson TH (2003) Comparisons of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biol Biochem* 35:955–963. doi:10.1016/S0038-0717(03)00154-8
- Balvanera P, Pfisterer AB, Buchmann N, He JS, Nakashizuka T, Raffaelli D, Schmid B (2006) Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecol Lett* 9:1146–1156. doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00963.x
- Baslam M, Pascual L, Sanchez-Dial M, Erro J, Garcia-Mina JM, Goicoechea N (2011) Improvement of nutritional quality of greenhouse-grown lettuce by arbuscular mycorrhizal fungi is conditioned by the source of phosphorus nutrition. *J Agric Food Chem* 59:11129–11140. doi:10.1021/jf202445y
- Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N (2011) Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J* 5:908–917. doi:10.1038/ismej.2010.171
- Bispo A, Grand C, Galsomies L (2009) Le programme ADEME “Bioindicateurs de qualité des sols”. *Étude Gest Sols* 16:145–158
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, van Themaat EVL, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmeller E, Peplies J, Gloeckner FO, Amann R, Eickhorst T, Schulze-Lefert P (2012) Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488:91–95. doi:10.1038/nature11336
- Catroux G, Hartmann A, Revellin C (2001) Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant Soil* 230:21–30
- Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, Fujimoto D, Mazzola M, Banger G, Kim D (1995) Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4197–4201
- Copetta A, Lingua G, Berta G (2006) Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. *Mycorrhiza* 16:485–494. doi:10.1007/s00572-006-0065-6
- Dequiedt S, Thioulouse J, Jolivet C, Saby NPA, Lelievre M, Maron PA, Martin MP, Chemidlin-Prévost-Bouré N, Toutain B, Arrouays D, Lemanceau P, Ranjard L (2009) Biogeographical patterns of soil bacterial communities. *Environ Microbiol Rep* 1:251–255. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00040.x
- Dequiedt S, Saby NPA, Lelievre M, Jolivet C, Thioulouse J, Toutain B, Arrouays D, Bispo A, Lemanceau P, Ranjard L (2011) Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Glob Ecol Biogeogr* 20:641–652. doi:10.1111/j.1466-8238.2010.00628.x
- Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:626–631. doi:10.1073/pnas.0507535103
- Fontaine S, Henault C, Aamor A, Bdioui N, Bloor JMG, Maire V, Mary B, Revalliot S, Maron PA (2011) Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biol Biochem* 43:86–96. doi:10.1016/j.soilbio.2010.09.017
- Friesen M, Porter SS, Stark SC, von Wettberg EJ, Sachc JL, Martinez-Romero E (2011) Microbially mediated plant functional traits. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 42:23–46. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102710-145039
- Gardi C, Montanarella L, Arrouays D, Bispo A, Lemanceau P, Jolivet C, Mulder C, Ranjard L, Roembke J, Rutgers M, Menta C (2009) Soil biodiversity monitoring in Europe: ongoing activities and challenges. *Eur J Soil Sci* 60:807–819. doi:10.1111/j.1365-2389.2009.01177.x
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MA, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20:519–530. doi:10.1007/s00572-010-0333-3
- Girvan MS, Campbell CD, Killham K, Prosser JI, Glover LA (2005) Bacterial diversity promoted community structure stability and functional resilience after perturbation. *Environ Microbiol* 7:301–313. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00695.x
- Gobat JM, Aragno M, Matthey W, Bally R (2010) Le sol vivant. Bases de pédologie, Biologie des sols, 3e édition revue et augmentée. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne
- Griffiths BS, Philippot L (2013) Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol Rev* 37:112–129. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x
- Griffiths BS, Ritz K, Bardgett RD, Cook R, Christensen S, Ekelund F, Sorensen SJ, Baath E, Bloem J, de Ruiter PC, Dolfing J, Nicolardot B (2000) Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos* 90:279–294
- Griffiths RI, Thomson B, James P, Bell T, Bailey M, Whiteley AS (2011) The bacterial biogeography of British soils. *Environ Microbiol* 13:1642–1654. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02480.x
- Henault C, Revellin C (2011) Inoculants of leguminous crops for mitigating soil emissions of the greenhouse gas nitrous oxide. *Plant Soil* 346:289–296. doi:10.1007/s11104-011-0820-0
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311:1–18. doi:10.1007/s11104-008-9668-3
- Horwath WR, Paul EA (1994) Microbial biomass. In: Weaver RW (ed) *Methods of soil analysis, SSSA book series 5*. Soil Sci Soc Am Inc, Madison, pp 727–752
- Horz HP, Barbrook A, Field CB, Bohannan BJM (2004) Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15136–15141. doi:10.1073/pnas.0406616101
- INRA (2010) Document d’orientation INRA 2010–2020, une science pour l’impact. INRA, Paris
- ISO Standard 11063 (2009) Soil quality—method to directly extract DNA from soil samples. ISO, Genève
- Johnson MJ, Lee KY, Scow KM (2003) DNA fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma* 114:279–303. doi:10.1016/S0016-7061(03)00045-4
- Jones RT, Robeson MS, Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N (2009) A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME J* 3:442–453. doi:10.1038/ismej.2008.127
- Lambert H, Mougel C, Jaillard B, Hinsinger P (2009) Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant Soil* 321:83–115. doi:10.1007/s11104-009-0042-x

- Lata JC, Guillaume K, Degrange V, Abbadie L, Lensi R (2000) Relationships between root density of the African grass *Hyparrhenia diplandra* and nitrification at the decimetric scale: an inhibition-stimulation balance hypothesis. *Proc Biol Sci* 267:595–600. doi:10.1098/rspb.2000.1043
- Lata JC, Degrange V, Raynaud X, Maron PA, Lensi R, Abbadie L (2004) Grass populations control nitrification in savanna soils. *Funct Ecol* 18:605–611. doi:10.1111/j.0269-8463.2004.00880.x
- Lawes JB, Gilbert JH, Warington R (1882) On the amount and composition of the rain and drainage water collected at Rothamsted. Clowes, London. Originally published in *J Royal Agr Soc Eng XVII* 1881:241–279, 311–350; *XVIII* 1882:1–71
- Leckie SE, Prescott CE, Grayston SJ, Neufeld JD, Mohn WW (2004) Comparison of chloroform fumigation extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biol Biochem* 36:529–532. doi:10.1016/j.soilbio.2003.10.014
- Lejon DPH, Chaussod R, Ranger J, Ranjard L (2005) Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). *Microb Ecol* 50:614–625. doi:10.1007/s00248-005-5130-8
- Lejon DPH, Sebastia J, Lamy I, Nowak V, Chaussod R, Ranjard L (2007) Microbial density and genetic structure in two agricultural soils submitted to various organic managements. *Microb Ecol* 53:650–653. doi:10.1007/s00248-006-9145-6
- Lemanceau P (2011) EcoFINDERS characterizes biodiversity and functions of soils in Europe 23 partners in 10 European countries and China. *Biofutur* 326:56–58
- Lindstrom K, Murwira M, Willems A, Altier N (2010) The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Res Microbiol* 161:453–463. doi:10.1016/j.resmic.2010.05.005
- Loreau M (2000) Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. *Oikos* 91:3–17. doi:10.1034/j.1600-0706.2000.910101.x
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrekton A, Kunin V, Rio TGD, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488:86–90. doi:10.1038/nature11237
- Manter DK, Delgado JA, Holm DG, Stong RA (2010) Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microb Ecol* 60:157–166. doi:10.1007/s00248-010-9658-x
- Maron PA, Ranjard L, Mougél C, Lemanceau P (2007) Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. *Microb Ecol* 53:486–493. doi:10.1007/s00248-006-9196-8
- Maron PA, Mougél C, Ranjard L (2011) Soil microbial diversity: spatial overview, driving factors and functional interest. *C R Acad Sci Biol* 334:403–411. doi:10.1016/j.crvi.2010.12.003
- Marstorp H, Guan X, Gong P (2000) Relationship between dsDNA, chloroform-labile C and ergosterol in soils of different organic matter contents and pH. *Soil Biol Biochem* 32:879–882
- Mavrodi OV, Mavrodi DV, Thomashow LS, Weller DM (2007) Quantification of 2,4 diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains in the plant rhizosphere by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 73:5531–5538. doi:10.1128/AEM.00925-07
- Mougél C, Maron PA, Philippot L, Ranjard L, Lemanceau P (2011) Translation of metagenomics agroecosystems in ecological services. *Biofutur* 319:44–47
- Naeem S, Li S (1997) Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature* 390:507–509. doi:10.1038/37348
- Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanism and controls. *Agronomie* 23:375–396. doi:10.1051/agro:2003011
- Nicolardot B, Bouziri L, Bastian F, Ranjard L (2007) A microcosm experiment to evaluate the influence of location and quality of plant residues on residue decomposition and genetic structure of soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* 39:1631–1644. doi:10.1016/j.soilbio.2007.01.012
- Peres G, Vandenbulcke F, Guernion M, Hedde M, Beguiristain T, Douay F, Houot S, Piron D, Richard A, Bispo A, Grand C, Galsomies L, Cluzeau D (2011) Earthworm indicators as tools for soil monitoring, characterization and risk assessment. An example from the national Bioindicator programme (France). *Pedobiologia* 54:S77–S87. doi:10.1016/j.pedobi.2011.09.015
- Petric I, Philippot L, Abbate C, Bispo A, Chesnot T, Hallin S, Laval K, Lebeau T, Lemanceau P, Leyval C, Lindström K, Pandard P, Romero E, Sarr A, Schlöter M, Simonet P, Smalla K, Wilke BM, Martin-Laurent F (2011) Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 “Soil quality—method to directly extract DNA from soil samples”. *J Microbiol Meth* 84:454–460. doi:10.1016/j.mimet.2011.01.016
- Philippot L (2002) Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochim Biophys Acta* 1577:355–376. doi:10.1016/S0167-4781(02)00420-7
- Philippot L, Hallin S (2011) Towards food, feed and energy crops mitigating climate change. *Trends Plant Sci* 16:476–480. doi:10.1016/j.tplants.2011.05.00
- Philippot L, Abbate C, Bispo A, Chesnot T, Hallin S, Lemanceau P, Lindström K, Pandard P, Romero E, Schlöter M, Simonet P, Smalla K, Wilke BM, Petric I, Martin-Laurent F (2010) Soil microbial diversity: an ISO standard for soil DNA extraction. *J Soils Sediments* 10:1344–1345. doi:10.1007/s11368-010-0265-8
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH (2013a) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* 11:789–799. doi:10.1038/nrmicro3109
- Philippot L, Spor A, Henault C, Bru D, Bizouard F, Jones CM, Sarr A, Maron PA (2013b) Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME J* 7:1609–1619. doi:10.1038/ismej.2013.34
- Plassart P, Terrat S, Thomson B, Griffiths R, Dequiedt S, Lelievre M, Regnier T, Nowak V, Bailey M, Lemanceau P, Bispo A, Chabbi A, Maron PA, Mougél C, Ranjard L (2012) Evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure. *PLoS One* 7:e44279. doi:10.1371/journal.pone.0044279
- Raaijmakers JM, Weller DM, Thomashow LS (1997) Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl Environ Microbiol* 63:881–887
- Rajendhran J, Gunasekaran P (2008) Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnol Adv* 26:576–590. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.08.002
- Ranjard L, Richaume AS (2001) Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res Microbiol* 152:707–716
- Ranjard L, Lejon DPH, Mougél C, Schehrer L, Merdinoglu D, Chaussod R (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ Microbiol* 5:1111–1120. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00521.x
- Ranjard L, Echairi A, Nowak V, Lejon DPH, Nouaïm R, Chaussod R (2006) Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural copper treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. *FEMS Microbiol Ecol* 58:303–315. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00157.x
- Ranjard L, Dequiedt S, Lelievre M, Maron PA, Mougél C, Morin F, Lemanceau P (2009) Platform GenoSol: a new tool for conserving and exploring soil microbial diversity. *Environ Microbiol Rep* 1:97–99. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00023.x
- Ranjard L, Dequiedt S, Jolivet C, Saby NPA, Thioulouse J, Harmand J, Loisel P, Rapaport A, Fall S, Simonet P, Joffre R, Chemidlin-Prévost Bouré N, Maron PA, Mougél C, Martin MP, Toutain B, Arrouays D, Lemanceau P (2010) Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing French National Initiative. *Agron Sustain Dev* 30:359–365. doi:10.1051/agro/2009033

- Redecker D, Raab P (2006) Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98:885–895. doi:[10.3852/mycologia.98.6.885](https://doi.org/10.3852/mycologia.98.6.885)
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289:1920–1921. doi:[10.1126/science.289.5486.1920](https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1920)
- Rutgers M, Schouten AJ, Bloem J, van Eekeren N, de Goede RGM, Akkerhuis GAJM, van der Wal A, Mulder C, Brussaard L, Breure AM (2009) Biological measurements in a nationwide soil monitoring network. *Eur J Soil Sci* 60:820–832. doi:[10.1111/j.1365-2389.2009.01163.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2009.01163.x)
- Schloss PD, Handelsman J (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* 14:303–310. doi:[10.1016/S0958-1669\(03\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00067-3)
- Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn. Academic, San Diego
- Smith KP, Handelsman J, Goodman RM (1999) Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4786–4790. doi:[10.1073/pnas.96.9.4786](https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.4786)
- Sprent JI (2008) 60 Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *J Exp Bot* 59:1081–1084. doi:[10.1093/jxb/erm286](https://doi.org/10.1093/jxb/erm286)
- Subbarao GV, Nakahara K, Hurtado MP, Ono H, Moreta DE, Salcedo AF, Yoshihashi AT, Ishikawa T, Ishitani M, Ohnishi-Kameyama M, Yoshida M, Rondon M et al (2009) Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17302–17307. doi:[10.1073/pnas.0903694106](https://doi.org/10.1073/pnas.0903694106)
- Tardy V, Mathieu O, Leveque J, Terrat V, Chabbi A, Lemanceau P, Ranjard L, Maron PA (2014) Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environ Microbiol Rep* 6:173–183. doi:[10.1111/1758-2229.12126](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12126)
- Tilman D, Wedin D, Knops J (1996) Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature* 379:718–720. doi:[10.1038/379718a0](https://doi.org/10.1038/379718a0)
- Tilman D, Knops J, Wedin D, Reich P, Ritchie M, Siemann E (1997) The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* 277:1300–1302. doi:[10.1126/science.277.5330.1300](https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1300)
- Torsvik V, Øvreås L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5:240–245
- Van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69–72. doi:[10.1038/23932](https://doi.org/10.1038/23932)
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem* 19:703–707
- Vogel TM, Simonet P, Jansson JK, Hirsch PR, Tiedje JM, van Elsas JD, Bailey MJ, Nalin R, Philippot L (2009) TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. *Nat Rev Microbiol* 7:252. doi:[10.1038/nrmicro2119](https://doi.org/10.1038/nrmicro2119)
- Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BB, Thomashow LS (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 40:309–348. doi:[10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010)
- Werner D, Newton WE (2005) Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment. Kluwer, Dordrecht
- Yachi S, Loreau M (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1463–1468. doi:[10.1073/pnas.96.4.1463](https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1463)
- Zancarini A, Mougel C, Terrat S, Salon C, Munier-Jolain N (2013a) Combining ecophysiological and microbial ecological approaches to study the relationship between *Medicago truncatula* genotypes and their associated rhizosphere bacterial communities. *Plant Soil* 365:183–199. doi:[10.1007/s11104-012-1364-7](https://doi.org/10.1007/s11104-012-1364-7)
- Zancarini A, Lépinay C, Burstin J, Duc G, Lemanceau P, Moreau D, Munier-Jolain N, Pivato B, Rigaud T, Salon C, Mougel C (2013b) Combining molecular microbial ecology with ecophysiology and plant genetics for a better understanding of plant-microbial communities interactions in the rhizosphere. Chapter 7. In: de Bruijn FJ (ed) *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*. Wiley, Hoboken, pp 69–86